

Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie

Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der Spannungsabhängigkeit des μ -Opioid Rezeptors

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Gisela Ruland

aus Aschaffenburg

Marburg/Lahn, 2020

Erstgutachter: **Prof. Dr. Moritz Bünemann**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Jens Kockskämper**

Eingereicht am **30. 10. 2020**

Tag der mündlichen Prüfung am **18. 12. 2020**

Hochschulkennziffer: 1180

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	4
3. Einleitung	6
3.1 Biologische Membranen	6
3.2 Spannungsabhängigkeit von Membranproteinen.....	7
3.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	9
3.4 G-Proteine	11
3.4.1 Der G-Protein-Zyklus.....	12
3.4.2 GIRK-Ströme	14
3.5 Homologe Desensitivierung und Internalisierung	15
3.5.1 Phosphorylierung über GRKs	15
3.5.2 Arrestin-Rekrutierung	16
3.6 Opioid-Rezeptoren.....	19
3.7 Spannungsabhängigkeit von GPCRs	20
3.8 Ziel der Untersuchungen.....	22
4. Material und Methoden	25
4.1 Technische Ausstattung	25
4.1.1 Laborausstattung	25
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
4.1.3 Ausstattung der Messplätze.....	26
4.1.4 Software	27
4.2 Reagenzien.....	27
4.2.1 Reagenzien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	27
4.2.2 Reagenzien zur Verwendung in der Molekularbiologie	28
4.2.3 Reagenzien zur Verwendung während der Messungen	29

4.3	Plasmide	30
4.4	Methoden	31
4.4.1	Zellkultur	31
4.4.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
4.4.3	Methoden zur Messung	40
4.4.4	Statistische Verfahren und Korrekturverfahren	48
5.	Generierung eines MOR-Sensors.....	53
5.1	Generierung eines Sensors mit Insertion an Position S266	53
5.1.1	Charakterisierung des S266 Sensor Konstrukts	54
5.1.2	Generierung eines S266-Sensor-Konstrukts mit Signalsequenz.....	55
5.1.3	Generierung eines S266-Sensor-Konstrukts mit verlängerter Linker-Region ...	56
5.1.4	Generierung eines S266-Sensor-Konstrukts mit FlAsH-Bindemotiv	57
5.2	Übersicht über weitere Klonierungsstrategien	58
5.3	Erläuterungen zur Generierung eines chimären MOR-S266- α_{2A} -i3-YFP-C-CFP	59
5.4	Bewertung der klonierten Konstrukte	59
6.	Molekulare Mechanismen der Spannungsabhängigkeit des MOR-Rezeptors.....	61
6.1	Die G-Protein-Aktivierung des MOR wird spannungsabhängig moduliert	61
6.1.1	Depolarisation verstärkt die Morphin-vermittelte G-Protein-Aktivierung	61
6.1.2	DAMGO-vermittelte G-Protein-Aktivierung wird moderat verstärkt durch Depolarisation	64
6.1.3	Spannungsabhängigkeit zeigt sich in gleichem Maße in der G_o - und G_i - Aktivierung	65
6.1.4	Met-Enkephalin-vermittelte G-Protein-Aktivierung reagiert insensitiv auf Depolarisation	66
6.1.5	Depolarisation führt zu einer moderaten Reduktion der Fentanyl-induzierten G- Protein-Inaktivierung	67
6.1.6	Buprenorphin-induzierte G-Protein-Aktivierung reagiert stark sensitiv auf Veränderungen im Membranpotenzial	69

6.1.7	Spannungsabhängige Effekte auf die G-Protein-Aktivierung zeigen sich auch bei einer raschen Abfolge kurzer Depolarisationen.....	70
6.2	Spannungsabhängige Effekte des MOR zeigen sich in einer veränderten Arrestin-Rekrutierung	71
6.2.1	Die maximale Effektstärke der Morphin-vermittelten Arrestin-Rekrutierung wird durch Depolarisation erhöht	72
6.2.2	Die Spannungssensitivität des Morphins reflektiert eine starke Veränderung in der Effektstärke.....	74
6.2.3	Depolarisation unter DAMGO-Applikation verdeutlicht die ligandenspezifischen Unterschiede	75
6.2.4	Die Spannungsinsensitivität des Met-Enkephalins bestätigt sich in der Arrestin-Rekrutierung	78
6.3	GRK2-Rekrutierung reflektiert die Spannungsabhängigkeit des MOR	79
6.3.1	Die Effektstärke der Morphin-vermittelten GRK2-Rekrutierung ist unter Depolarisation stark erhöht.....	79
6.3.2	Effekte der Depolarisation auf Morphin- oder DAMGO-induzierte GRK2 – Rekrutierung verdeutlichen Liganden-spezifische Unterschiede	82
6.4	Die Spannungssensitivität des MOR lässt sich durch Veränderungen im GIRK-Strom zeigen	83
6.4.1	Ströme in Einwärtsrichtung zeigen stärkere Spannungssensitivität des Morphins	84
6.4.2	Ströme in Auswärtsrichtung zeigen stärkere Spannungssensitivität des Morphins.....	86
6.4.3	Daten aus GIRK-Strömen in HEK 293T Zellen lassen sich mit G _i -Protein-Aktivierungsassay reproduzieren.....	88
6.4.4	Morphin- induzierte GIRK-Ströme in LC Neuronen werden stärker potenziert als DAMGO- oder Met-Enkephalin-induzierte Ströme.....	89
7.	Diskussion	94
7.1	Aktivität des MOR wird spannungsabhängig sehr stark moduliert.....	95

7.2 Die beobachteten spannungsabhängigen Veränderungen am MOR treten im Bereich der physiologischen Membranpotenziale auf.	96
7.3 Die Spannungsabhängigkeit verändert die maximale Effektstärke des Morphins in besonders großem Umfang.	97
7.4 Die starke spannungsabhängige Modulation des MOR wird sowohl in der G-Protein-Signaltransduktion, als auch in der GRK2- und Arrestin-Interaktion sichtbar.....	99
7.5 Auch in physiologischem Gewebe kann die Spannungsabhängigkeit des MOR beobachtet und gemessen werden.	100
7.6 Die Spannungsabhängigkeit des MOR ist ligandenspezifisch.	103
7.7 Perspektiven.....	104
8. Literaturverzeichnis.....	106
9. Abbildungsverzeichnis	119
10. Publikationen und wissenschaftliche Betreuung	121
10.1 Konferenzbeiträge und Abstracts.....	121
10.2 Artikel in wissenschaftlichen Journalen	121
10.3 Stipendien	122
10.4 Wissenschaftliche Betreuung.....	122
11. Lebenslauf	123
12. Erklärung	125
13. Danksagungen	126

Abkürzungsverzeichnis

α_{2A} AR	α_{2A} adrenerger Rezeptor
aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> , künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
AP	<i>Activating protein</i>
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
β_2 AR	β_2 -adrenerger Rezeptor
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i> (Fluoreszenzprotein)
CS	<i>Cutting solution</i> , Lösung zur Schnittgenerierung
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-Enkephalin
dd	Bidestilliert
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DOR	δ -Opioid-Rezeptor
e_0	Elementarladung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular-signal related kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

FlAsH	<i>Fluorescein Arsenic Hairpin</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
fw	<i>forward</i> ; bezeichnet einen Primer, der sich an den (-) Template-Strang anlagert
G	Glycin
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> (GTP - Austauschfaktor)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Fluoreszenzprotein)
ggfs.	gegebenenfalls
GIRK	<i>G-protein activated inwardly rectifying K⁺ channel</i> (G-Protein aktivierter einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal)
Glu	Glutaminsäure
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	<i>G-protein coupled receptor kinase</i> (GPCR Kinase)
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i> (humane embryonale Nierenzellen)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPSF	<i>High Purification Salt Free</i> , entsalzt und hoch aufgereinigt
kb	Kilobasenpaar
KO	<i>knock-out</i>
KOR	κ -Opioid-Rezeptor
LC	Locus Coeruleus
Lys	Lysin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

Met-Enkephalin	[5-Methionin]-Enkephalin
min	Minute
MOR	μ -Opioid-Rezeptor
msec	Millisekunde
mTur	mTurquoise
mV	Millivolt
(m/V)	Masse / Volumen
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PLC	Phospholipase C
PH	Pleckstrin-Homologie
rev	<i>reverse</i> ; bezeichnet einen Primer, der sich an den (+) Template-Strang anlagert
RGS	<i>Regulator of G-Protein Signaling</i> (Regulator der G-Protein-Signaltransduktion)
rpm	Rotationen pro Minute
SGLT1	<i>Sodium-glucose linked transporter</i> (Natrium – Glucose – Co-Transporter)
sYFP	superYFP (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
TM	Transmembrandomäne
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i> , Transienter Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal der Unterfamilie V, des Subtyps 1
Tyr	Tyrosin
V	Volt
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i> (Fluoreszenzprotein)
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

In jüngerer Zeit haben eine Reihe von Studien gezeigt, dass die membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) in ihrer Funktion durch das elektrische Membranpotenzial beeinträchtigt werden. Diese spannungsabhängige Modulation kann je nach betrachtetem Rezeptor und je nach Liganden zu einer Aktivierung oder Deaktivierung führen, die aus Veränderungen in der Ligandenaffinität oder Effektstärke resultiert. Obwohl bereits eine Reihe von Rezeptoren charakterisiert werden konnten, bleibt der zugrundeliegende Mechanismus größtenteils unklar. Ebenso weiß man bis heute nicht viel über die pharmakologische Relevanz der Spannungsabhängigkeit in nativem Gewebe.

In der vorliegenden Studie wurde der μ -Opioid-Rezeptor (MOR) in Bezug auf spannungssensitives Verhalten charakterisiert. Die physiologische Rolle des MOR liegt in einer Hemmung pronozizeptiver Signale auf prä- und postsynaptischer Ebene. Die wichtigsten Schmerzmittel zur Behandlung mittelstarker bis starker Schmerzen adressieren den MOR. Als neuronaler Rezeptor ist der MOR starken und hochfrequenten Änderungen im Membranpotenzial ausgesetzt. Die Spannungsabhängigkeit wurde in vorliegender Studie auf mehreren Ebenen beleuchtet: in der G-Protein-Aktivierung, β -adrenergen Rezeptorkinase (GRK2, englisch G-protein coupled receptor kinase 2)- und Arrestin3-Interaktion wurde die Spannungssensitivität des MOR auf molekularer Ebene beobachtet, indirekt gemessen durch Protein-Protein-Interaktionen der Effektoren. Dies konnte durch einen Versuchsaufbau gewährleistet werden, der Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) Messungen zwischen fluoreszent markierten Fusionsproteinen unter Manipulation des Membranpotenzials im *whole-cell* (englisch: ganze Zelle) Spannungsklemmen-Modus erlaubt. In weiteren Versuchen wurden die pharmakologischen Implikationen der Spannungsabhängigkeit des Rezeptors unter Manipulation des Membranpotenzials untersucht. Dafür wurden zum einen MOR-induzierte GIRK-Ströme (G-Protein-aktivierter, einwärtsgerichteter Kanal) in transfizierten HEK 293T Zellen in Einwärts- und Auswärtsrichtung aufgezeichnet und zum anderen Messungen der GIRK-Ströme in einzelnen Neuronen aus Locus Coeruleus (LC) Präparationen durchgeführt¹.

Auf molekularer Ebene wurde in allen untersuchten Interaktionen eine starke spannungsabhängige Steigerung der Morphin-induzierten Rezeptoraktivierung gefunden. Besonders ausgeprägte spannungsabhängige Auswirkungen fanden sich in der Fähigkeit des

¹ Messungen durchgeführt von S. Klindert und C.P. Bailey an der University of Bath, Großbritannien

Morphin-aktivierten MORs, GRK2 und Arrestin3 zu rekrutieren. Morphin wurde in der Literatur bereits als Ligand mit niedriger intrinsischer Effektstärke charakterisiert und zeigt im Vergleich zu peptidergen Liganden (DAMGO, Met-Enkephalin) in nicht-depolarisierten Zellen nur eine geringfügige GRK2- und Arrestin3-Rekrutierung. Bei Depolarisation innerhalb der physiologischen Bandbreite an Membranpotenzialen zeigte sich allerdings eine mehrfache Steigerung der initialen Rekrutierung, die als gesteigerte Effektstärke identifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu reagierte der DAMGO-aktivierte MOR nur geringfügig spannungssensitiv und unter Met-Enkephalin konnte keine messbare Veränderung in Abhängigkeit des Membranpotenzials festgestellt werden. In einem kleinen Exkurs wurde weiterhin beobachtet, dass der hochpotente Ligand Fentanyl unter Depolarisation sogar eine Deaktivierung des Rezeptors zeigt, während der strukturell mit Morphin verwandte Ligand Buprenorphin bei Depolarisation, ähnlich wie Morphin, eine starke Zunahme in der Effektstärke zeigt.

Bei Betrachtung der Veränderungen des Morphin-induzierten, MOR-vermittelten GIRK-Stroms wurde in transfizierten HEK 293T sowohl in Einwärts- als auch in Auswärtsrichtung eine starke Steigerung des Signals detektiert, obwohl für diese Messungen – im Gegensatz zu den FRET-Messungen aufgrund der Kanaleigenschaften nur ein Teil der physiologischen Bandbreite des Membranpotenzials zur Verfügung stand. Es wurde weiterhin versucht, diese, in HEK 293T Zellen bereits auf physiologischer Ebene evident gewordene Spannungsabhängigkeit in einzelnen Neuronen in Schnitten, welche natives LC Gewebe enthielten, nachzuweisen. Obwohl hierbei die, für die Messungen geeignete Bandbreite des Membranpotenzials noch kleiner war, zeigte sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der Morphin-induzierten GIRK-Ströme im Vergleich zu peptidergen Liganden.

Die vorliegende Arbeit zeigt zusammenfassend die starke, ligandenabhängig unterschiedliche Modulation des MOR, die sich bis hin zu einer veränderten GIRK-Kanal-Aktivierung bemerkbar macht und somit nahelegt, dass depolarisationsinduzierte Rezeptormodulation auch pharmakologische Relevanz besitzt.

Stichworte:

Förster Resonanz Energie Transfer (FRET), G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), MOR-Signaltransduktion, G-Protein-aktivierter einwärtsgerichteter Kalium (GIRK) Kanal, $G_{i/o}$ -

Protein, intramolekularer Rezeptor-Sensor, Arrestin3, GRK2, Affinität, Effektstärke, opioiderge Analgetika;

2. Summary

Recently, in a series of studies it has been proven, that the function of membranous G-protein coupled receptors (GPCR) is modulated by the membrane potential. Depending on the type of receptor or ligand, the observed voltage-dependent changes may lead to an enhanced or decreased receptor activity which may be due to a change in affinity and also efficacy. Despite of an increasing number of receptors being characterized, the underlying mechanism of voltage sensitivity remains rather obscure. Also, there is little knowledge about pharmacological implications of voltage sensitivity in native tissue.

In the present study the μ -opioid receptor (MOR) has been characterized with regard to voltage sensitivity. As activation of the MOR leads to a decreased propagation of pronociceptive stimuli, the receptor is the most important target for analgesics in treatment of moderate to severe pain. Being expressed in neuronal tissue, the MOR is exposed to robust and high-frequency changes in membrane potential. In the present study voltage sensitivity was elucidated at different levels: in G-protein activation, G-protein coupled receptor kinase 2 (GRK2)- and Arrestin3-recruitment, the voltage sensitivity of the MOR was elucidated on a molecular level by analyzing protein - protein interactions of effectors. To this aim, a setup which allows for the determination of ratiometric Foerster Resonance Energy Transfer (FRET) measurements between fluorescently labelled fusion proteins upon manipulation of the membrane potential by whole cell voltage clamp was used. A further set of experiments, which measured alterations of G-protein activated inwardly rectifying K^+ (GIRK) currents, allowed for investigation of the pharmacological consequences of voltage sensitivity. To this aim, MOR-evoked GIRK currents were characterized upon depolarization both in inward and outward direction in transfected HEK 293T cells. Moreover, these currents were also determined in neurons that contained preparations of Locus Coeruleus (LC) neurons².

On a molecular basis, a strong voltage dependent increase in morphine-mediated receptor activation was observed on all investigated levels of signaling. The most striking impacts of voltage on signaling were found in the GRK2- and Arrestin3-recruitment to the morphine-activated MOR.

According to previous publications, morphine has been characterized to be a ligand with low intrinsic efficacy, causing only minor recruitment of GRK2 and Arrestin3 in non-depolarized cells to the receptor, when compared with the peptidergic ligands DAMGO or Met-

² LC measurements were performed by S. Klindert and C. P. Bailey, University of Bath

enkephaline. However, upon depolarization to different membrane potentials within the physiological range, a remarkable increase of the initial recruitment was observed and the occurring changes could be identified to demonstrate a change in efficacy. In contrast, investigation of voltage sensitive modulations of the DAMGO-activated receptor showed only minor changes in all observed interactions and the Met-enkephaline activated receptor even exhibited no detectable voltage sensitivity. In a subset of experiments, voltage sensitivity of fentanyl and buprenorphine, two further opioids of therapeutic relevance were tested. While the morphine-like substance buprenorphine showed – similar to morphine – a strong increase in efficacy upon depolarization, for fentanyl which is a structurally different type of ligand, a decrease of MOR-activity was observed upon depolarization.

Characterization of changes in morphine-induced MOR-mediated GIRK currents due to depolarization in transfected HEK 293T cells showed an increase of currents both in outward and inward direction, although in these measurements only a small range of potentials within the physiological range of membrane potentials was suited for characterization, due to the physiologic properties of these channels. In a further set of experiments, the investigation of voltage sensitive effects on morphine-mediated GIRK currents in native tissue was performed. In these experiments, slices containing LC neurons were used for measurements. Although measurements in this delicate tissue allow for measurements in an even smaller range of membrane potentials, a significant increase in morphine-mediated GIRK currents, as compared to DAMGO- or Met-enkephaline-mediated currents was observed upon depolarization.

In summary, this work demonstrates the strong voltage dependent modulation of MOR-signaling, which occurs to different extents and qualities dependent on the ligand applied. In case of the strong voltage sensitivity of the morphine-activated receptor, these changes become evident even on the level of GIRK currents in physiological tissue suggesting pharmacological relevance of voltage induced alterations of MOR activity.

Keywords:

Foerster Resonance Energy Transfer (FRET), G-protein coupled receptors (GPCRs), MOR-signaling, G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channel, G_{i/o}-protein, intramolecular receptor-sensor, Arrestin3, GRK2, affinity, efficacy, opioidergic analgesics;

3. Einleitung

3.1 Biologische Membranen

Die Begrenzung und Stabilisierung zellulärer Systeme wird durch Membranen bewerkstelligt. Diese Membranen sind nach ihrer Struktur als Lipiddoppelschicht anzusehen, wobei die polaren Kopfgruppen zu den wässrigen Lösungen im Extrazellulärraum und Intrazellulärraum weisen und die hydrophoben Fettsäureanteile zueinander in die Innenseite der Membran gewandt sind. Membranen sind üblicherweise elektrisch polarisiert, wobei die Innenseite im nicht erregten Zustand negative Ladung aufweist. Diese Ladung ist je nach Zelltyp unterschiedlich und kann Werte bis zu -100 mV aufweisen¹.

Dieses Ruhemembranpotenzial resultiert aus der unterschiedlichen Ionenverteilung im Intrazellulärraum im Vergleich zum Extrazellulärraum: während intrazellulär K^+ überwiegt (155 mM innen; 4 mM außen), findet sich extrazellulär überwiegend Na^+ (145 mM außen; 12 mM innen). Die Konzentrationen von Cl^- (120 mM außen; 4 mM innen) und HCO_3^- (27 mM außen; 8 mM innen) sind außen höher. Die Leitfähigkeit für die Ionen und intrazellulären Bestandteile sind unterschiedlich hoch. So werden negativ geladene Proteine aus dem Zytosol nicht nach außen geleitet, ferner ist die K^+ -Leitfähigkeit hoch, wohingegen die Na^+ -Leitfähigkeit nur 4 % davon beträgt². Der elektrochemische Gradient wird durch Ionenpumpen wie die Na^+/K^+ -ATPase aufrecht erhalten, die Na^+ und K^+ im Verhältnis 3:2 transportiert³.

Die großen Ladungsunterschiede zwischen Extrazellulär- und Intrazellulärseite werden durch die sehr dünne hydrophobe Membranschicht (ca. 27 Å) getrennt, welche als Dielektrikum des Kondensators dient und dabei ein starkes elektrisches Feld erzeugt ($\sim 10^7$ V/m)⁴. Durch Reorientierung geladener Moleküle bei Änderung dieses elektrischen Felds kann es in den integralen Membranproteinen zu deutlichen Konformationsänderungen kommen. Diese Reorientierungen können die Aktivität dieser Proteine in Abhängigkeit des Membranpotenzials deutlich modulieren⁴. Dass zahlreiche Ionenkanäle sensitiv auf Veränderungen des Membranpotenzials reagieren ist schon lange bekannt⁵.

In den letzten 20 Jahren erlangte man auch deutlich mehr Kenntnis über die Existenz weiterer spannungsabhängiger Proteine an der Plasmamembran, wie den spannungsabhängigen Phosphatasen⁶, Ionencarriern⁷ oder Pumpen⁸. Eine weitere Erkenntnis der letzten beiden Dekaden ist, dass auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sensitiv auf Veränderungen im Membranpotenzial reagieren. Diese Spannungsabhängigkeit soll mit Fokus auf dem, in stark

erregbarem neuronalem Gewebe exprimierten μ -Opioid-Rezeptor (MOR) in dieser Arbeit untersucht werden.

3.2 Spannungsabhängigkeit von Membranproteinen

Wie bereits in Kapitel 3.1 angeführt, reagieren eine Reihe von Proteinen sensitiv auf die Veränderungen, im elektrischen Feld der Plasmamembran, indem eine elektrische Ladung oder ein Dipol unter Veränderung des elektrischen Feldes umorientiert wird. Mit diesem Schritt werden so häufig zelluläre Prozesse, wie die Regulation des Ruhemembranpotenzials, Generierung eines Aktionspotenzials oder Phosphorylierungsprozesse spannungsabhängig moduliert. Viele Proteine, die an synaptischer Transmission oder zellulärer Homöostase beteiligt sind, werden auf diese Art reguliert ⁴.

Resultat der Umorientierung der Ladungen oder Dipole ist stets eine konformationelle Änderung des Proteins. Die spannungssensitiven Ladungen innerhalb des Proteins sind häufig die flexiblen Seitenketten der Aminosäuren Asp, Glu, Lys oder Arg. Seitenketten von Tyr sind häufige, sich reorientierende Dipole. Ein weiterer spannungsabhängiger Prozess kann die Anlagerung freier Ladungen aus intramolekularen Kavitäten sein. Durch die Ladungsanlagerungen werden dann weitere konformationelle Umordnungen im Protein initiiert. Wenn spannungsabhängige Ladungen von Membranproteinen innerhalb des Transmembranbereichs des Proteins bewegt werden, kommt es dadurch auch in Intrazellulär- und Extrazellulärmilieu zur proportionalen Ladungsverschiebungen, die einen messbaren Strom erzeugen. Solche spannungsabhängigen Ströme wurden erstmals an Na^+ -Kanälen beobachtet ⁵ und wurden seit jener Entdeckung als ‚gating currents‘ bezeichnet, da sie zeitlich mit der Öffnung des Kanals korrelieren. Auch in vorliegender Arbeit wird im weiteren Verlauf der Begriff ‚gating currents‘ verwendet. Diese Ströme werden als Elementarladungsverschiebungen angegeben und variieren je nach spannungsabhängigem Protein. Besonders große Ladungsverschiebungen finden sich bei spannungsabhängigen Ionenkanälen, die im Bereich von 13 Elementarladungen (e_0) (Shaker K^+ Kanäle ^{9,10}) bis 9 e_0 (Ca^{2+} Kanäle ¹¹) liegen. In all diesen Proteinen finden große konformationelle Umlagerungen bei Veränderung des Membranpotenzials statt, da diese Kanäle über ein S4-Segment verfügen. Im Falle der Shaker K^+ Kanäle weist dieses Segment eine hohe Dichte an basischen Aminosäuren auf, während die benachbarten Segmente S2 und S3 über zahlreiche saure Aminosäuren verfügen. Bei Depolarisation kommt es zu einer drastischen Umlagerung des basischen S4-Segments, die zu einer veränderten Leitfähigkeit für K^+ durch die Porenschleife führt. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals wird dadurch in sehr starkem Ausmaß

spannungsabhängig reguliert: Depolarisation um 10 mV erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit um den Faktor 150⁴.

Ebenfalls über ein S4-Segment, jedoch nicht über eine Porenschleife verfügt der spannungsabhängige Protonen-Kanal¹². In allen bisher genannten Kanälen führt Depolarisation zur erhöhten Leitfähigkeit des Kanals. Allerdings verfügen auch Kanäle über S4-Segmente, die bei Depolarisation inaktiviert werden, wie z.B. der Hyperpolarisations-aktivierte-Zyklonukleotid-regulierte- (HCN)-Kanal¹³ oder der hERG-Kanal (englisch: human-Ether-a-go-go related gene)¹⁴.

Auch enzymatische Funktionen können, wie im Falle der spannungsabhängigen Phosphatase CiVSP unter Depolarisation hergestellt werden. Auch hier stellt ein S4-Segment die spannungssensitive Komponente im Protein dar⁶. Spannungsabhängige Transporter und Pumpen sowie GPCRs grenzen sich allerdings mechanistisch von den beschriebenen Proteinen mit S4-Segment ab. Während Letztere ausführlich in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben werden und daher an dieser Stelle nicht auf GPCRs eingegangen wird, soll noch der Na⁺-Glucose-Co-Transporter (SGLT1) Erwähnung finden. Dieser Co-Transporter nutzt die Energie eines Na⁺-Gradienten um Glucose entgegen des Konzentrationsgradienten über die Plasmamembran zu transportieren. Da sich unter Entzug von Na⁺-Ionen am SGLT1 eine Veränderung in der Abhängigkeit zwischen Elementarladungsverschiebung und dem Membranpotenzial (sog. Q-V-Kurve) zeigte, wurde darauf geschlossen, dass die Bewegung des Na⁺-Ions im Transporter innerhalb des elektrischen Feldes selbst zu einem Teil der Elementarladungsverschiebung beiträgt. Da jedoch immer noch eine restliche (1.4 e_0 von ursprünglich 3,5 e_0) spannungsabhängige Elementarladungsverschiebung messbar war, wird angenommen, dass der Transporter über weitere spannungsabhängige Gruppen verfügt^{7,15}.

Auch die Na⁺ K⁺-ATPase, die durch Einhaltung der Stöchiometrie aus 3 Na⁺ und 2 K⁺ selbst einen Auswärtsstrom generiert, der zum negativen Ruhemembranpotenzial beiträgt, wird spannungsabhängig reguliert. Unter Bedingungen, in denen ATP und Na⁺ im Zytosol und K⁺ im Extrazellulärraum in sättigenden Konzentrationen vorliegen, wurde für die Pumpe eine Spannungsabhängigkeit mit steilem, sigmoidalem Verlauf beschrieben, die bei hypophysologisch negativem Membranpotenzial vernachlässigbar geringe Ströme generiert und bei 0 mV bereits das Plateau erreicht hat¹⁶. Da viele Membranproteine in ihrer Funktion in großem Ausmaß vom Membranpotenzial reguliert werden, ist von großem Interesse, ob ein GPCR, der in hoch erregbarem neuronalen Gewebe exprimiert wird, wie der MOR, ebenfalls spannungsabhängig moduliert wird.

3.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen eine große Familie an Rezeptoren dar, die über 950 Mitglieder beinhaltet ¹⁷. Strukturell ist den GPCRs ihre heptahelikale Struktur gemeinsam, mit der sie die Plasmamembran mit 7 Transmembrandomänen (TM) durchspannen. GPCRs werden durch unterschiedlichste extrazelluläre Signale, wie Gerüche, Licht, Geschmack, Hormone oder Wachstumsfaktoren aktiviert und leiten als integrale Membranproteine Signale an den Intrazellulärraum weiter (ausführlich besprochen in ¹⁸).

Die Rezeptorfamilie lässt sich aufgrund ihrer funktionellen Merkmale in fünf Klassen unterteilen: Rhodopsin- (Klasse A), Sekretin-/Adhesion- (Klasse B), Glutamat- (Klasse C), Frizzled/TAS-Rezeptoren sowie weitere, nicht weiter eingegliederte Rezeptoren ¹⁹. Da den GPCRs vielfältige Rollen in der humanen Pathophysiologie zukommen, adressiert derzeit jeder dritte neue Wirkstoff (~ 34 %; Stand: 2017) einen von 108 derzeit als therapeutisches Target adressierten GPCRs ²⁰. Die behandelten Krankheitsbilder sind vielfältig und reichen von Übergewicht über Bluthochdruck bis hin zu neurologischen Erkrankungen ²⁰.

Die Ligandenbindung erfolgt meist innerhalb des gebündelten transmembranären Bereichs des GPCRs, kann aber auch am N-Terminus erfolgen ²¹. Resultierend aus der Ligandenbindung kommt es zu einer Reihe von konformationellen Umlagerungen am Rezeptor, ausgehend von der Ligandenbindetasche bis hin zu den intrazellulären Bereichen des GPCRs ²². Dabei kann eine Vielzahl Liganden-spezifischer Konformationen eingenommen werden, die mit verschiedenen strukturellen Charakteristika und funktionellen Implikationen einhergehen ^{23–25}. In einer Studie, die die Kristallstrukturen des inaktiven ²⁶ MOR mit dem, durch den synthetischen Morphin-ähnlichen Liganden BU72 aktivierten ²⁷ MOR, der in seinem aktiven Zustand durch einen synthetischen Nanokörper (englisch: *nanobody*) stabilisiert wird, vergleicht, wird deutlich, dass es bei Aktivierung des Rezeptors, ähnlich wie beim β_2 AR ²⁸, zu einer großen, auswärts gerichteten Bewegung der TM 6 und einer kleineren einwärts gerichteten Bewegung der TM 5 und 7 kommt (siehe **Abbildung 1**).

Nach klassischer Sicht leiten membranständige GPCRs nach erfolgter Aktivierung Signale mittels G-Proteinen weiter. Neben diesem Signalweg (besprochen in 3.4) gibt es weitere Möglichkeiten der GPCR-vermittelten Signaltransduktion. So wurde für den β_2 AR eine G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung von Endosomen aus beobachtet ²⁹. Entgegen der früheren Ansicht, GPCRs reagierten lediglich als monomere Proteine auf externe Stimuli, existiert heute vielfältige Evidenz dafür, dass GPCRs mit weiteren membranständigen

Interaktionspartnern, wie GPCRs in einer Homo- oder Heterodimerisierung³⁰, Ionenkanälen³¹ oder ionotropen Rezeptoren³² durch direkte Bindung interagieren können. Eine solche Interaktion führt in der Regel zu einer Feinjustierung des GPCR-Signals oder der Rezeptor-Pharmakologie³³.

Ferner wurde eine allosterische Modulation des GPCR-vermittelten Signals für zahlreiche Faktoren, wie Ionen, bestimmte chemische Verbindungen, Lipide³⁴, aber auch das Membranpotenzial (^{35–46}, diese Arbeit⁴⁷) beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit ist die Interaktion von GPCRs mit zytoplasmatischen Proteinen, wie GRKs⁴⁸ (sh. Kapitel 3.5.1), Arrestinen⁴⁹ (sh. Kapitel 3.5.2) oder PDZ-Domänen enthaltenden Proteinen (ausführlich besprochen in^{33,50}).

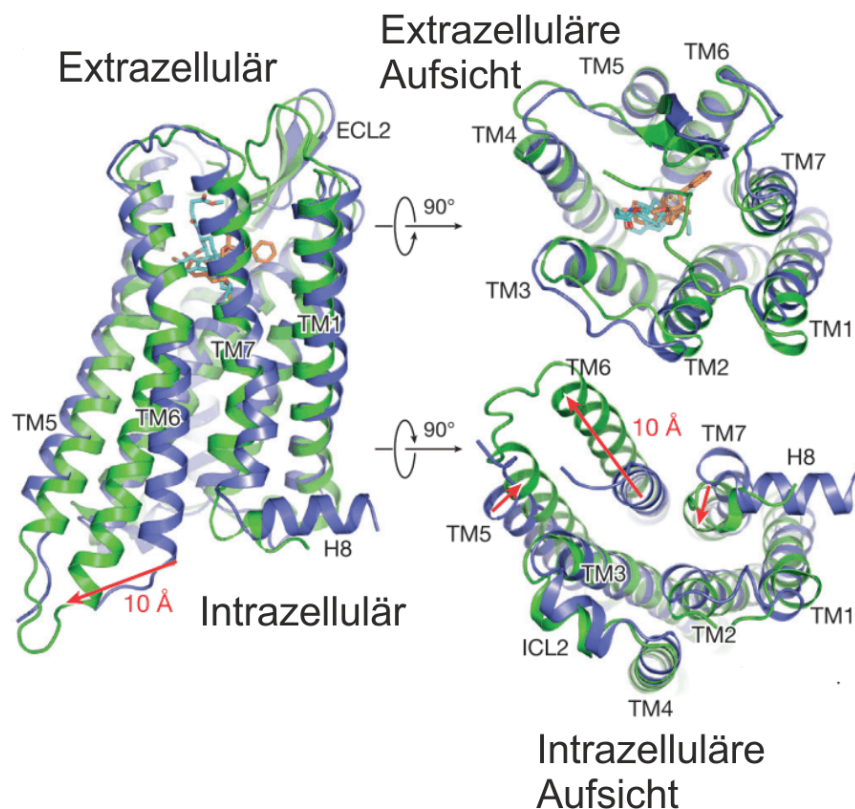


Abbildung 1: Vergleich der Strukturen des aktiven und inaktiven MOR.

Die inaktive Kristallstruktur des MOR ist in blau dargestellt, die aktive Struktur ist in grün zu sehen. Links werden die Strukturen in der Seitenansicht gezeigt, rechts finden sich Darstellungen der Aufsicht von extrazellulärer bzw. intrazellulärer Seite. Die markantesten Bewegungen bei Rezeptoraktivierung sind mit roten Pfeilen dargestellt. Die Kristallstruktur wurde unter Bindung des Morphin-ähnlichen Liganden BU72 und Zuhilfenahme des, den aktiven Zustand stabilisierenden Nanokörpers Nb39 erhalten (Abbildung modifiziert nach²⁷);

3.4 G-Proteine

Extrazelluläre Stimuli, die zur GPCR-Aktivierung führen, werden über G-Proteine an zytoplasmatische Effektoren übermittelt. Sie setzen sich aus heterotrimeren Untereinheiten zusammen. Benannt werden G-Proteine im Allgemeinen nach der beteiligten $G\alpha$ -Untereinheit. Hierbei lassen sich die G-Proteine in 4 Familien unterteilen: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$. Der in dieser Studie verwendete MOR bindet selektiv Proteine der $G\alpha_i$ -Familie, welche die größte und diverseste Familie der $G\alpha$ -Proteine darstellt und folgende 7 Proteine umfasst: $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_g$, $G\alpha_z$. Von den genannten $G\alpha$ -Subtypen existieren wiederum verschiedene Splice-Varianten ($G\alpha_{oA}$, $G\alpha_{oB}$) oder Isoformen ($G\alpha_{t1}$, $G\alpha_{t2}$). Für die $G\beta$ -Untereinheiten kodieren noch 5 verschiedene Gene ($G\beta_{1-5}$), wobei $G\beta_{1-4}$ eine 80 – 90 % Sequenzhomologie aufweisen. Für die $G\gamma$ -Untereinheiten wurden 12 kodierende Gene identifiziert, die zueinander weniger Sequenzhomologien als die $G\beta$ -Untereinheiten aufweisen (ausführlich besprochen in ⁵¹). Eine Prenylierung im C-Terminus gewährleistet eine Membran-Verankerung der γ -Untereinheit ⁵². In der vitalen Zelle liegt $G\beta\gamma$ als Dimer vor ⁵³, es sind keine Funktionen für nicht dimerisierte β und γ Untereinheiten beschrieben ⁵¹. Obwohl eine Vielzahl an Kombinationen aus β und γ Untereinheiten theoretisch möglich ist, zeigen die verschiedenen $G\beta\gamma$ -Isoformen in in-vitro Assays recht ähnliche biochemische Aktivitäten (ausführlich besprochen in ⁵¹).

Kürzlich wurde eine Kryo-elektronenmikroskopische Struktur des MOR im DAMGO-aktivierten Zustand, gebunden und stabilisiert durch ein nukleotidfreies G_i -Protein beschrieben ⁵⁴. Dies ermöglicht einen Vergleich zu dem ebenfalls mit gebundenem G_s -Protein publizierten β_2AR ²⁸ und zeigt, dass sich die Struktur des G_i -gekoppelten MOR unter anderem in der Position der TM6 sowie in der Interaktionsfläche der $G\alpha$ -Untereinheit mit dem Kern des Rezeptors unterscheidet (siehe **Abbildung 2 A**). Diese Faktoren scheinen die G-Protein-Spezifität des MOR, der selektiv Proteine der $G_{i/o}$ -Familie bindet, zu beeinflussen (siehe **Abbildung 2 B**) ⁵⁴.

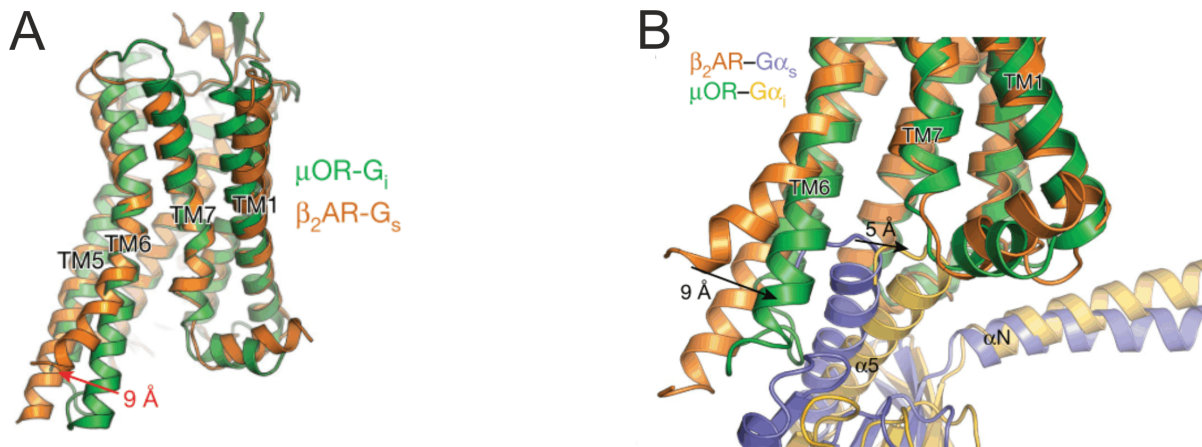


Abbildung 2: Vergleich der Strukturen von MOR und β_2 AR in G-Protein-gebundener Konformation.

A, Die Struktur des aktiven, G_i -Protein – gebundenen MOR ist in grün dargestellt, die Struktur des, an ein G_s -Protein gebundenene β_2 AR ist in orange in Seitenansicht gezeigt. Der rote Pfeil markiert den stärksten konformationellen Unterschied zwischen den beiden Rezeptoren. Der Unterschied besteht in einer um 9 Å weiter nach außen abstehenden Knickung in der TM6 des β_2 AR im Vergleich zum MOR. B, Vergleich der Konformationen der $\alpha 5$ -Helix der G-Proteine ($\text{G}\alpha_s$ ist in Violett und $\text{G}\alpha_i$ in Gelb gekennzeichnet) und der TM6 der Rezeptoren (β_2 AR ist in Orange und MOR in Grün gekennzeichnet) ⁵⁴;

3.4.1 Der G-Protein-Zyklus

Über den kanonisch ablaufenden G-Protein-Zyklus können Stimuli, erzeugt durch die Bindung extrazellulärer Liganden über Aktivierung eines GPCRs an intrazelluläre Effektoren der Zelle weitergegeben werden. Im inaktiven Ausgangszustand ist ein GDP an die $\text{G}\alpha$ -Untereinheit gebunden. Die Interaktion der $\text{G}\alpha$ -Untereinheit mit einem aktivierten GPCR, das hier als *Guanine Nucleotide Exchange Factor* (GEF) fungiert, beschleunigt die Freisetzung des gebundenen GDPs sehr stark ^{55,56} (siehe **Abbildung 3**). Möglich wird die Abdissoziation des GDP durch eine Konformationsänderung, bei der sich die Ras-Domäne und helikale Domänen der $\text{G}\alpha$ -Untereinheit voneinander weg bewegen und damit das zuvor eng eingepackte GDP freilassen ^{28,57–59}. Die Freisetzung des gebundenen GDPs ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Austausch von GDP gegen GTP, denn das GTP kann aufgrund der hohen intrazellulären Konzentrationen von GTP (ca. 200 – 300 μM) rasch folgen ⁶⁰. Die Bindung des GTPs bewirkt konformationelle Änderungen in der $\text{G}\alpha$ -Untereinheit, die zur Dissoziation vom

Rezeptor und der Interaktion der $G\alpha$ -Untereinheiten mit diversen Effektoren wie der Adenylylcyclase, Phospholipase C oder den RhoGEFs führt. Die membranständigen $G\beta\gamma$ -Untereinheiten vermögen, verschiedene Proteine (z.B. GRKs) an die Plasmamembran zu rekrutieren oder direkt die Aktivität von Ionenkanälen, Kinasen oder Phospholipasen zu modulieren (ausführlich besprochen in ^{24,56}).

Zumindest für den G_i -Protein-Komplex ($G\alpha_{i1-3}$, $G\alpha_z$) wurde eine konformationelle Neuordnung der G-Protein-Untereinheiten anstelle einer Dissoziation des Komplexes vorgeschlagen ⁶¹. Dies zeigte sich sowohl in ⁶¹, als auch in vorliegender Studie in G_i -Protein-Aktivierungsassays in erhöhtem Energietransfer und somit einer räumlichen Annäherung der Untereinheiten bei G_i -Protein-Aktivierung. Diese Beobachtung, die spezifisch für $G\alpha_{i1-3}$ und $G\alpha_z$ zu sein scheint, spricht gegen eine Abdissoziation der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten von den entsprechenden $G\alpha$ -Untereinheiten. Eine weitere Beobachtung, die diese Theorie stützt, ist die Entdeckung von Bindestellen für $G\alpha$ -Untereinheiten an GIRK Kanälen. Diese Bindestellen scheinen den K^+ -Strom durch diesen Kanal mit zu regulieren ⁶². Die Verringerung in der YFP/CFP Emission, die unter Aktivierung der G_o -Proteine zwischen den $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten gemessen wird und die eine räumliche Entfernung der Untereinheiten anzeigt, muss nicht zwangsläufig auf eine Dissoziation hindeuten, sondern kann auch aus einer konformationellen Umlagerung resultieren ⁶³. Beendet wird der G-Protein-Zyklus durch Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP und Phosphat. Die $G\alpha$ -Untereinheit besitzt hierfür eine GTPase-Domäne, welche zudem Bindungsfläche für die $\beta\gamma$ -Untereinheiten sowie einige Effektoren bildet. GTP-Hydrolyse kann durch das *Regulator of G-Protein Signaling* Protein (RGS) beschleunigt werden ⁵⁶.

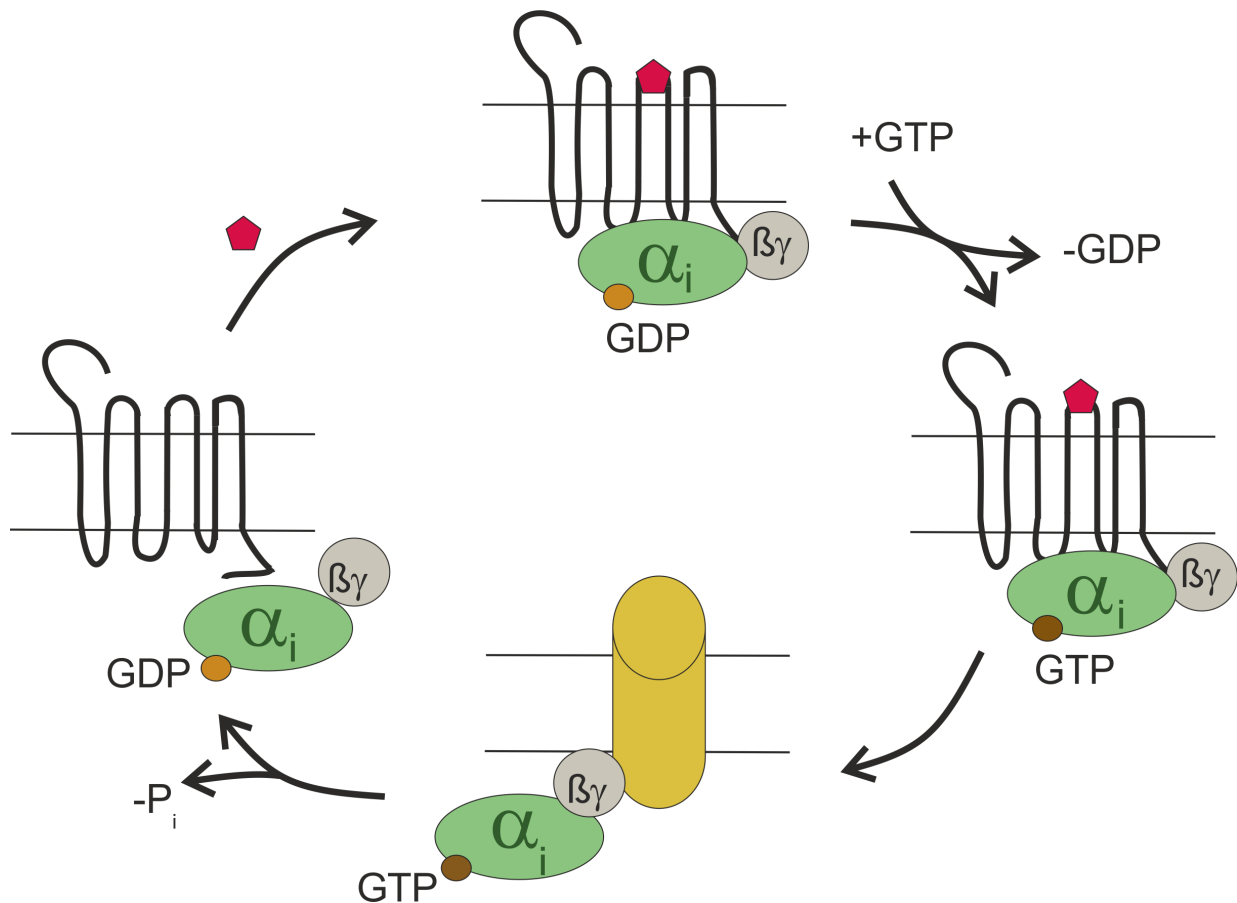


Abbildung 3: Schematische Darstellung des G-Protein-Aktivierungszyklus.

Im inaktiven Zustand liegt das G-Protein an GDP gebunden vor (oben). Ligandenbindung (rotes Pentagon) aktiviert den Rezeptor, was wiederum die Abdissoziation und den Austausch des GDP gegen GTP beschleunigt. Im aktiven Zustand (unten) steuert die $\beta\gamma$ -Untereinheit das Effektorprotein an (Ionenkanal). Hydrolyse des GTPs zu GDP und P_i durch die GTPase-Funktion der α -Untereinheit beendet den G-Protein-Zyklus;

3.4.2 GIRK-Ströme

Ein direkter Effekt der Aktivierung von inhibitorischen, PTX-sensitiven G-Proteinen ist die Modulation von G-Protein-aktivierten einwärtsgerichtenden K^+ (GIRK)-Kanälen. Die Bezeichnung „einwärtsgleichrichtend“ resultiert aus der Eigenschaft der Kanäle, am Gleichgewichtspotenzial für K^+ einen starken Abfall in der Steigung bzw. „Nullstrom“ der Strom – Spannungskennlinie des Einwärtsstroms aufzuweisen⁶⁴, der durch den Verschluss der Kanalpore mit Mg^{2+} und Polyaminen aus dem Intrazellularraum erfolgt⁶⁵. Neben des Einwärtsstroms findet unter physiologischen Bedingungen auch ein Auswärtsstrom statt, der die neuronale Erregbarkeit herabsetzt⁶⁴ und das Ruhemembranpotenzial um ~ 8 mV verschiebt⁶⁶. In Säugetieren wurden 4 verschiedene Untereinheiten (GIRK1 – 4 bzw. Kir 3.1 – 3.4)

nachgewiesen⁶⁴. Von GIRK2 existieren 3 Spleißvarianten im Gehirn, die sich in der Länge des C-Terminus unterscheiden. Der wesentlichste Unterschied zwischen den 3 Varianten ist das Vorhandensein eines PDZ-Bindemotivs bei GIRK2c, über das GIRK2a und 2b nicht verfügen^{67,68}. Im Gehirn wurden vor allem heterotetramere Kanäle aus GIRK1/3 und GIRK2/3^{69,70} nachgewiesen. Von den GIRK-Untereinheiten sind GIRK2 die einzigen, die auch Homotetramere bilden können^{67,71}.

Die Regulation der GIRK-Kanäle durch G-Proteine erfolgt durch Bindung zahlreicher Kombinationen aus G $\beta\gamma$ -Untereinheiten an den Kanal^{69,72}. Es können dabei pro Kanal maximal 4 G $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden⁷³. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die G $\alpha_{i/o}$ -Untereinheiten dabei direkt die Rezeptor-Spezifität der GIRK-Kanal Modulation vermitteln^{61–63,74,75}. Aus dieser Modulation kann je nach Zellsystem eine postsynaptische Hemmung im Neuron selbst, oder neuronaler Netzwerke resultieren⁶⁴.

3.5 Homologe Desensitivierung und Internalisierung

3.5.1 Phosphorylierung über GRKs

Wie bereits im Kapitel 3.3 besprochen, können aktivierte GPCRs nicht nur durch G-Proteine Signalweiterleitung betreiben, sondern interagieren auch mit zahlreichen transmembranären oder zytosolischen Proteinen³³. Hierzu gehören auch die im Menschen nachgewiesenen Serin- und Threoninkinasen der GPCR-Kinasen (GRK) - Familie (GRK1-7)⁷⁶ (siehe **Abbildung 4**). Die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten am C-Terminus ligandenaktivierter GPCRs durch GRKs stellt nach klassischer Ansicht den ersten Schritt der homologen Desensitivierung dar⁷⁷ und erleichtert die Bindung von Arrestinen (siehe Kapitel 3.5.2)⁷⁸. Die verschiedenen GRK Proteine unterscheiden sich bezüglich ihrer Lokalisation und Struktur: so werden GRK1 und 7 überwiegend in der Retina exprimiert und GRK4 in nennenswerter Menge nur in Hoden. Im Gegensatz dazu kommen GRK2 (β -adrenerge Rezeptor-Kinase 1/ β -Arrestin 1), GRK3 (β -adrenerge Rezeptor-Kinase 2/ β -Arrestin 2) sowie GRK5 und 6 ubiquitär vor⁷⁹. Strukturell unterscheiden sich die GRK2 und 3 durch das Vorhandensein einer C-terminalen PH-Domäne von den anderen GRKs. Diese PH-Domäne interagiert mit G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und vermittelt so die Membranlokalisation. Im Gegensatz dazu zeigen GRK4 und 6 am C-Terminus eine Palmitoylierungsstelle, die in diesen Enzymen wiederum die Membranlokalisation vermittelt. In GRK1 und 7 findet sich eine sehr kurze C-terminale Prenylierungssequenz⁸⁰. Bei GRK5 erfolgt die Membranlokalisation über die N-terminale Bindung an Phosphatidyl-Bisphosphat⁷⁹.

Strukturelle Analysen der Komplexe aus GPCRs mit G-Proteinen, GRKs und Arrestinen zeigen, dass alle drei mit den GPCRs interagierenden Proteine bevorzugt die bei Rezeptoraktivierung auf zytoplasmatischer Seite gebildete Kavität zwischen den Helices zu binden scheinen ^{28,81,82}. Dies bestätigt also die klassische Ansicht, dass GRKs den ligandenaktivierten Rezeptor binden. Allerdings existiert zumindest für die Enzyme GRK4 bis 6 Evidenz, dass diese auch den inaktiven GPCR zu binden vermögen und die dabei generierte Phosphorylierung auch zur Arrestin-Rekrutierung führen kann ⁸³.

Die Rolle der GRKs besteht klassischerweise in einer Regulierung der GPCR-Aktivität über Phosphorylierung zytoplasmatischer Serin- und Threoninreste. Hierbei phosphorylieren GRK2 und 3 typischerweise andere Reste als GRK4 – 6 ⁸⁰. Am Beispiel des MOR wurde gezeigt, dass im gleichen Zellsystem je nach Ligand im Bereich des ³⁷⁰TREHPSTANT³⁷⁹ Abschnitts im C-terminalen Teil ein ligandenspezifisch unterschiedliches Phosphorylierungsmuster unter Rekrutierung unterschiedlicher GRKs erzeugt werden kann: so führt Applikation von Agonisten mit hoher Effektstärke, wie dem DAMGO über GRK2 und 3 zu einer extensiven Phosphorylierung der Reste T370, T376 und T379, während Morphin, ein Ligand mit niedriger Effektstärke lediglich eine GRK5-vermittelte Phosphorylierung des S375 zeigt ⁸⁴, die zudem kaum Internalisierung bewirken kann ⁴⁸.

Desensitivierung scheint zudem nicht immer streng an GRK2-vermittelte Phosphorylierung geknüpft zu sein: für den metabotropen Glutamaterezeptor 5 wurde gezeigt, dass er auch über phosphorylierungsdefiziente GRK2 desensitiviert wird ⁸⁵.

3.5.2 Arrestin-Rekrutierung

Nach der klassischen Ansicht stellt die Arrestin-Rekrutierung an den ligandenaktivierten, extensiv über GRK 2 bzw. 3 C-terminal ^{86,87} phosphorylierten Rezeptor den zweiten Schritt der homologen Desensitivierung dar ^{88,89} (siehe **Abbildung 4**). Ursprünglich nahm man an, dass die Hauptaufgabe der Arrestine in einer sterischen Behinderung der G-Protein-Kopplung an GPCRs bestünde ⁹⁰. Neben eines klassischen Herunterfahrens des aus dem G-Protein-Aktivierungsweg resultierenden Signals kommt es durch die Arrestin-Rekrutierung jedoch auch zu einer Rekrutierung zahlreicher Effektorproteine durch das Arrestin wie dem ADP-Ribosylierungsfaktor ARF6 ⁹¹, Clathrin ⁹² oder $\beta(2)$ -Adaptin (AP2) ⁹³. Durch die Interaktion der Arrestine mit den beiden letztgenannten Proteinen kann der aktivierte Rezeptor zur Endozytose zu clathrinbedeckten Stachelsaumgrübchen gebracht werden ⁹⁴ (siehe **Abbildung 4**). Somit ist Arrestin von

grundlegender Bedeutung für die anschließende Degradation oder die Wiederverwertung von GPCRs⁹⁵⁻⁹⁷.

Zunächst wurde die Existenz von Arrestinen in retinalem Gewebe nachgewiesen, wenig später entdeckte man, dass ähnliche Proteine auch am β_2 AR eine Rolle in der Desensitivierung spielen⁷⁷. Bis heute kennt man in Säugetieren vier Arrestine, wobei Arrestin-1 und -4 hauptsächlich in retinalen Zellen vorkommen und Arrestin2 und -3 ubiquitär im Körper exprimiert werden⁹⁰. Aus historischen Gründen werden die beiden letztgenannten Arrestine auch häufig als β -Arrestin 1 und 2 bezeichnet⁹⁸, da dort zunächst eine Herunterregulation des β -adrenergen Signaltransduktion beschrieben wurde. Arrestin2 und -3 zeigen 78 % Sequenzhomologie.

Eine weitere zellphysiologisch bedeutende Interaktion ist die der β -Arrestine mit Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), einer Familie von Serin-/Threoninkinasen, zu denen auch die ERK 1/2 (englisch: extracellular-signal regulated kinase) Proteine gehören, die Einfluss auf Transkription, Zellzyklusprogression und Apoptose nehmen⁸⁹. Aktuell wird in der Wissenschaft kontrovers diskutiert, ob die Phosphorylierung von ERK tatsächlich ein primär Arrestin-vermittelter Vorgang ist, da diese in jenen Experimenten auch bei völligem Knock-out der β -Arrestine, nicht aber in Abwesenheit der G-Proteine beobachtet wurde⁹⁹, wohingegen andere Arbeiten relativieren und die Beteiligung sowohl von G-Proteinen als auch Arrestinen unter Berücksichtigung des zellulären Kontextes sehen¹⁰⁰.

Ebenfalls extensiv diskutiert wurde, ob der μ -Opioid-Rezeptor aktivierte Arrestin-Signalweg, wenn er mit dem in dieser Studie verwendeten Liganden Morphin ausgelöst wurde, ursächlich für die, unter Opioidtherapie beobachteten Nebenwirkungen der Atemdepression oder Verstopfung sei, wie dies eine frühere Studie unter Verwendung von β -Arrestin 2 KO Mäusen¹⁰¹ belegte. Nach aktuellen Erkenntnissen aus Studien, die ebenfalls mit KO Mäusen arbeiteten¹⁰², konnte dies jedoch ausgeschlossen werden. Stattdessen scheint nach neuen Daten eher eine generelle, geringe intrinsische Aktivität eines Liganden das Auftreten von Nebenwirkungen zu reduzieren¹⁰³.

Arrestin-vermittelte Internalisierung wurde durch den, in der vorliegenden Studie extensiv charakterisierten Liganden Morphin in verschiedenen Studien an HEK 293 Zellen¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ und in kortikalen Neuronen¹⁰⁷ in keinem nennenswerten Ausmaß beobachtet, wohingegen Enkephaline und andere, synthetische Liganden dies vermochten. Interessanterweise wurde in einer Studie an striatalen Neuronen eine rasche und starke Morphin-induzierte Internalisierung beobachtet, die durch Arrestin-3 vermittelt wurde¹⁰⁸ und bis auf die proximalen Axone im

gesamten Neuron auftrat. Daher wird auch bei der Rezeptorinternalisierung und Umverteilung eine Beeinflussung durch den zellulären Kontext vermutet, die auch auf Unterschiede im Membranpotenzial zurückzuführen sein könnte.

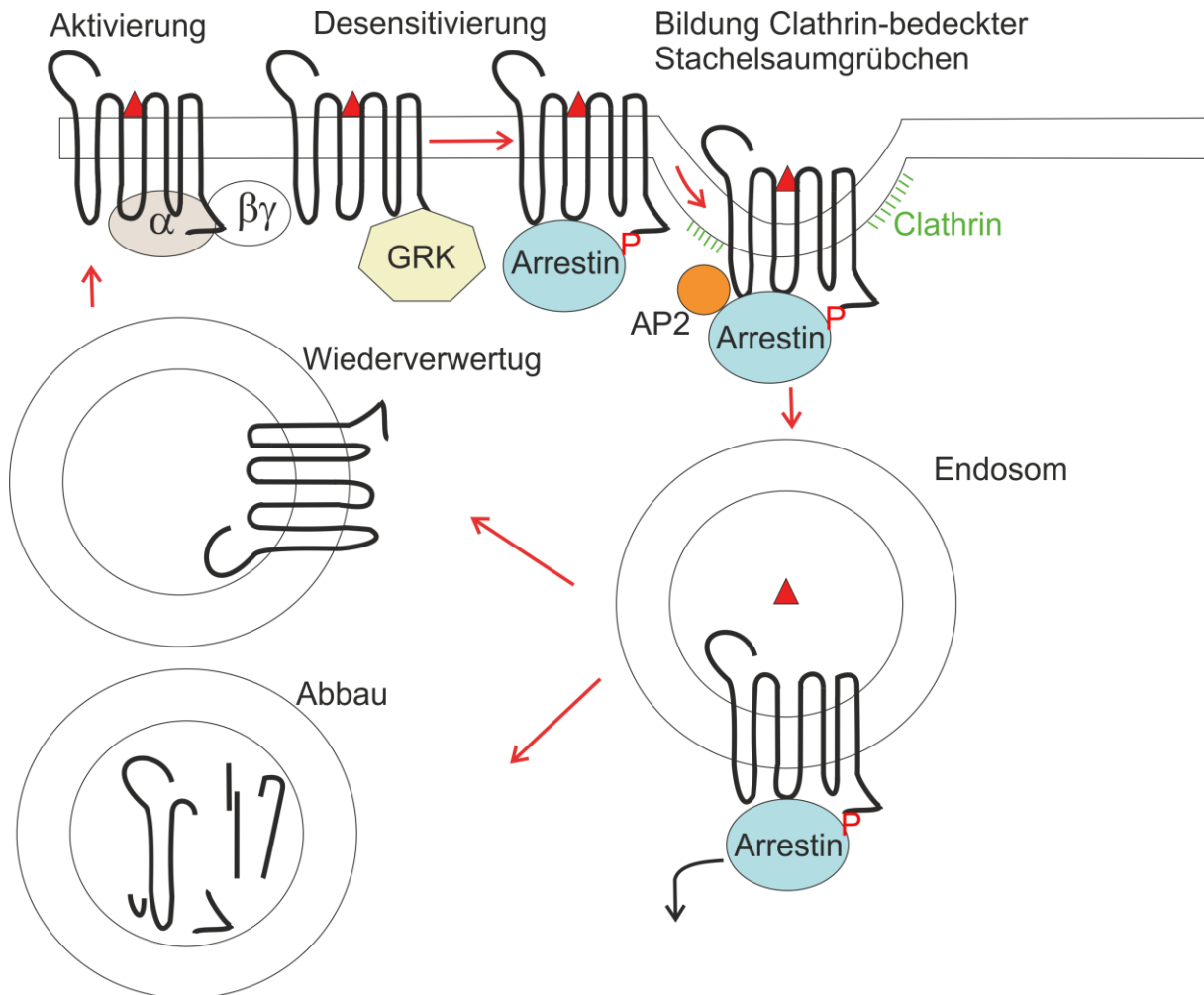


Abbildung 4: Darstellung der Desensitivierung, Internalisierung und Degradation bzw. Wiederverwertung von GPCRs.

Ligandenaktivierter GPCR wird über GRK2 phosphoryliert wodurch Arrestin-3-Anlagerung erfolgen kann; in der Interaktion des Arrestins mit Clathrinen und AP2 kommt es zur Bildung Clathrin-bedeckter Stachelsaumgrübchen; nach Abschnürung Clathrin-bedeckter Vesikel (nicht dargestellt) kommt es zur Endosomenbildung und von dort ausgehend zur lysosomalen Degradation oder Wiederverwertung des GPCRs an der Plasmamembran;

3.6 Opioid-Rezeptoren

Opioid-Rezeptoren lassen sich in μ (MOR), κ (KOR) und δ (DOR) Rezeptoren unterteilen¹⁰⁹ und reihen sich mit ca. 700 weiteren Rezeptoren in die Rhodopsin-Klasse der GPCRs ein²¹. Die Rezeptoren dieser Klasse weisen in der Regel charakteristische Merkmale, wie das NSxxNPxxY Motiv in der TM 7 oder das D(E)RY Motiv am Übergang von TM3 zur zweiten intrazellulärer Schleife auf²¹. Die Rhodopsin-Familie lässt sich weiter unterteilen. Hierbei zählt man Opioid-Rezeptoren zum γ -Zweig der Klasse, der weitere peptiderge Rezeptoren wie z.B. Somatostatin-Rezeptoren umfasst²¹.

Zwischenzeitlich hatte man auch Sigma-, Epsilon- und Orphanin-Rezeptoren zu den Opioid-Rezeptoren zugeordnet, mittlerweile werden sie allerdings aufgrund von strukturellen Analysen nicht mehr zu den Opioid-Rezeptoren gezählt^{110,111}. Zwischen den klassischen Opioid-Rezeptoren wurde eine 50 – 70 % Sequenzhomologie gefunden¹⁹, es sind aber weitere pharmakologische Unterteilungen in alternative Spleißvarianten, posttranslational unterschiedlich modifizierte Rezeptoren oder Rezeptor-Oligomere unterschiedlicher Zusammensetzung möglich¹¹¹. Von allen 3 Rezeptoren existieren mittlerweile hochaufgelöste Kristallstrukturen bzw. Kryo-elektronenmikroskopische Studien^{26,54,112,113}.

Opioid-Rezeptoren sind im ZNS sowie auch in der Peripherie vorhanden und dienen dort der Hemmung der Weiterleitung pronozizeptiver Signale und der Schmerzverarbeitung¹¹⁰. Ihre natürlichen Liganden sind peptidische Ketten mit 5 – ca. 30 Aminosäuren¹¹⁴. Die endogenen Opioide werden durch Spaltung aus den Propeptiden Proenkephalin, A, Prodynorphin und Proopiomelanocortin hergestellt. Die daraus gebildeten Liganden binden die drei Opioid-Rezeptoren mit unterschiedlicher Präferenz und Spezifität, wobei Enkephaline den DOR, Dynorphine der KOR und Endorphine den MOR bevorzugt binden¹¹⁴. In der vorliegenden Studie wurde die MOR-vermittelte Modulation bis zur Ebene der GIRK-Ströme unter Manipulation des Membranpotenzials untersucht.

3.6.1 μ -Opioid-Rezeptor

Benannt nach dem aus *Papaver somniferum* gewonnenen Alkaloid Morphin, das bevorzugt an diesen Rezeptor bindet¹⁰⁹, stellt der μ -Opioid-Rezeptor (MOR) unter den Opioid-Rezeptoren das wichtigste Target in der analgetischen Pharmakotherapie dar⁵⁴. Neben dem Einsatz zur Therapie mittelstarker bis starker Schmerzen¹¹⁵ kommt zahlreichen MOR-Liganden aufgrund ihrer euphorisierenden Effekte auch im Substanzmissbrauch eine große Bedeutung zu¹¹⁶. Ligandenbindung in der orthosterischen Bindetasche führt zur

Konformationsänderung im MOR und wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben zu einer Aktivierung heterotrimerer $G_{i/o}$ -Proteine. Durch die Bindung aktivierter $G\beta\gamma$ -Untereinheiten an präsynaptische N-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Cav2.2) ¹¹⁷ oder postsynaptische G-Protein-aktivierte einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle (GIRK) ⁶⁴ kommt es zu einem verringerten Ca^{2+} -Einstrom und zu einer verringerten Freisetzung pronozizeptiver Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ¹¹⁸ sowie zu einer erhöhten K^+ -Leitfähigkeit ⁶⁴. Weitere, weniger untersuchte Effekte der MOR-Aktivierung sind eine Hemmung von Na^+ - I_h -, Vanilloid- (TRPV1)- und Säure-sensitiven Kanälen ^{119–123}, welche ebenfalls in einer verminderten Schmerzwahrnehmung münden ¹¹⁰. Die Phosphorylierung des MOR über GRKs wurde in zahlreichen Studien untersucht ^{48,124,125}. Dabei zeigte sich für den MOR ein Agonisten-abhängiges, variables Phosphorylierungsmuster, das durch unterschiedliche Beteiligung der verschiedenen GRKs zustande kommt ⁸⁴ (siehe auch 3.5.1). Auch die Bindung des phosphorylierten, Liganden-aktivierten MOR durch Arrestine erfolgt nach einem Liganden-abhängigen Muster und in Abhängigkeit des GRK-vermittelten Phosphorylierungsmusters ¹²⁵ ebenfalls in sehr unterschiedlichem Ausmaß ⁴⁹.

Auch auf die Aktivität zahlreicher weiterer Signalmoleküle wie die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) und der Phospholipase C (PLC) hat der MOR Einfluss ¹²⁶. Ferner wurden die Vorgänge der Rezeptor-Heteromerisierung und allosterischen Rezeptor-Modulation am MOR ^{111,127} intensiv untersucht. Hierzu wurde in Spinalganglien beobachtet, dass es beispielsweise durch eine Interaktion von MORs und DORs zu einer verbesserten Kopplung an Ca^{2+} -Kanäle kommt ¹²⁸.

Gegenstand dieser Studie war der MOR, bei dem wir uns, vor allem aufgrund seiner Expression in leicht erregbarem neuronalem Gewebe ¹¹⁰ für die Veränderungen in der Rezeptoraktivität unter Depolarisation interessieren.

3.7 Spannungsabhängigkeit von GPCRs

In den letzten zwei Dekaden wurden zahlreiche GPCR in Bezug auf Spannungsabhängigkeit charakterisiert ^{35,36,41,44–46,129–132}, die dabei vielfältige Einflüsse des Membranpotenzials auf Rezeptoren selbst und die daraus resultierenden Implikationen auf die nachgeschaltete Signaltransduktion beschreiben. Dabei ist die Klassifizierung der von Depolarisation in ihrer Aktivität beeinflussten Rezeptoren vielfältig: es werden sowohl Effekte auf Klasse A ^{41,129,130} ^{35,36,44–46,131} als auch Klasse C ¹³² GPCRs beschrieben, die die Aktivität der GPCRs modulieren. Sieht man sich die Strukturen der natürlichen Liganden dieser Rezeptoren an, so sind diese äußerst vielfältig: neben muskarinergen ^{35,44} GPCRs wurden

weiterhin Rezeptoren charakterisiert, die von aminergen^{45,46,129,130 129}, purinergen⁴¹, lipidischen¹³¹ oder glutamatergen¹³² Liganden adressiert werden;

In frühen Publikationen wurden mittels Radioliganden-Bindungsstudien spannungsabhängige Effekte auf die Affinität von Liganden zu GPCRs festgestellt^{36,133–135}. Mittlerweile konnte jedoch mehrfach und unter anderem in dieser Arbeit⁴⁷ gezeigt werden, dass ebenso die maximale Effektstärke eines Liganden durch Depolarisation moduliert werden kann^{45,46}. Häufig werden am gleichen Rezeptor für unterschiedliche Liganden sehr unterschiedliche Effekte der Depolarisation auf die Liganden-vermittelte Signalweiterleitung beobachtet. So wird am α_{2A} -Rezeptor unter Depolarisation beispielweise für den natürlichen Liganden Noradrenalin eine 5-fache Reduktion der Affinität beobachtet, während das Imidazolin-Derivat Clonidin unter Depolarisation eine drastische Verringerung der maximalen Effektstärke in der Sättigung erfährt⁴⁵. Auch ligandenspezifische, gegenläufige Effekte auf die Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung wurden schon beobachtet: so konnte für den M₃-Rezeptor gezeigt werden, dass es unter Applikation von Carbachol oder Acetylcholin bei Depolarisation zu einer verringerten Rezeptoraktivität kommt, während diese unter Applikation von Cholin oder Pilocarpin verstärkt wird⁴⁴. Ein übergreifender Mechanismus, der mechanistisch alle bisher charakterisierten Eigenschaften der Spannungsabhängigkeit in GPCRs beschreiben kann, konnte bisher noch nicht gefunden werden. Im Jahr 2006 wurde am M₁- und M₂-Rezeptor gezeigt, dass diese Rezeptoren unter Depolarisation Ladungsverschiebungs-Ströme („gating currents“), ähnlich zu den spannungsabhängigen Ionenkanälen zeigen³⁶.

Im Gegensatz zu den GPCRs kennt man den Spannungssensor spannungsabhängiger K⁺-Kanäle relativ genau (siehe auch Kapitel 3.2); betrachtet man den Aufbau der homotetrameren Komplexe, die aus 6 Untereinheiten aufgebaut sind (S1 – S6), so fällt auf, dass das S4 Segment einen hohen Anteil basischer Aminosäuren aufweist¹³⁶, bei dem jede dritte Aminosäure ein Arginin oder Lysin ist. Im Gegensatz mit den S2 und S3 Segmenten, bei denen ein hoher Anteil an sauren Aminosäuren aufweist, führt das S4 Segment bei Depolarisation eine große konformationelle Umlagerung durch, die die Leitfähigkeit der Porenschleife verändert (ausführlich besprochen in¹³⁷). Den indirekten Beweis dafür, dass das S4-Segment als Spannungssensor im Kanal dient, lieferte der Nachweis, dass es zu „gating currents“ zwischen den vier äußerst zur Extrazellulärseite gelegenen basischen Aminosäuren und den am tiefsten intrazellulär gelegenen sauren Aminosäuren des S2-Segments kommt. Dieser Beweis wurde

indirekt durch gezielte Mutation dieser Reste und Vergleich der resultierenden ‚gating currents‘^{10,138} geführt.

Da es bei GPCRs keine, zum S4-Segment vergleichbaren potenziellen Spannungssensoren gibt (siehe auch Kapitel 3.2), erfolgte hier bisher noch keine vollständige mechanistische Aufklärung.

Der Nachweis der Spannungsabhängigkeit als intrinsische Eigenschaft der jeweiligen GPCRs konnte erstmals durch Charakterisierung der ‚gating currents‘ an M₁- und M₂-Rezeptoren³⁶ erbracht werden. Bestärkt wurden diese Befunde dadurch, dass am M₂ Rezeptor die Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung mit der Spannungsabhängigkeit der Ligandenbindung verknüpft werden konnte¹³⁴. Hierfür wurde der Rezeptor an bestimmten Aminosäureresten an der Extrazellulärseite fluoreszent markiert und dadurch Konformationsänderungen verfolgt und diese in Korrelation zu Ladungsverschiebungen gezogen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass bei Depolarisation unter anderem eine Bewegung geladener Aminosäuren stattfindet, die Einfluss auf die Ligandenbindetasche haben könnten. Auch am α_2A -⁴⁵ und am β_1 -AR⁴⁶ konnte die Spannungsabhängigkeit als intrinsische Rezeptoreigenschaft bewiesen werden. Hierfür wurden an Intrazellulärseite zweifach fluoreszenzmarkierte Rezeptorkonstrukte verwendet, welche die konformationellen Veränderungen im Rezeptormolekül bei Aktivierung als Verringerung in der FRET-Ratio abbilden (genauere Beschreibung der Vorteile eines Rezeptor-Sensors in Kapitel 5).

3.8 Ziel der Untersuchungen

Die Rezeptoraktivität von GPCRs kann durch das Membranpotenzial verändert werden. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Spannungsabhängigkeit intrinsische Eigenschaft des Rezeptors selbst ist^{36,45,135}. Als dies im Jahr 2003 für den M₂R³⁵ erstmalig publiziert wurde, widersprach dies der vorherrschenden Auffassung, dass GPCRs aufgrund des Fehlens größerer geladener Molekülteile, wie einem S4-Segment, im Gegensatz zu spannungsabhängigen Ionenkanälen spannungsinsensitiv seien^{4,35}.

Seither wurden zahlreiche Rezeptoren, die zur Klasse der Rhodopsin- oder Glutamat-Rezeptoren gehören in Bezug auf spannungssensitives Verhalten charakterisiert. Es wurde dabei Evidenz für die Spannungsabhängigkeit von Rezeptoren, die Proteine vom G_q-, G_{i/o}- oder G_s-Typ aktivieren, gefunden. Die bereits charakterisierten Rezeptoren werden durch eine heterogene Gruppe an natürlichen Liganden aktiviert, wie aminerge^{129,130,139}, purinerge^{43,140}, glutamaterge¹³², lipidische^{38,131} oder cholinerge^{35,44,133,134,141} Verbindungen. Bisher gab es

allerdings keine Untersuchungen zu GPCRs, die durch peptiderge Liganden aktiviert werden. Aufgrund der hohen therapeutischen Relevanz und der Expression in physiologisch leicht erregbarem Gewebe erschien uns besonders interessant, den μ -Opioid-Rezeptor als prominenten Vertreter der peptidischen GPCRs in Bezug auf mögliches spannungssensitives Verhalten zu untersuchen.

Hierbei sollte zunächst mittels FRET-basierter Assays auf molekularer Ebene geklärt werden, ob der Rezeptor durch Veränderungen innerhalb der physiologischen Bandbreite des Membranpotenzials moduliert wird und wenn dies der Fall ist, wie groß der Einfluss dieser Modulationen auf die MOR-vermittelte Signaltransduktion sei.

Sollten spannungsabhängige Effekte am MOR festgestellt werden, so muss im weiteren Verlauf geklärt werden, ob diese eher verursacht durch eine veränderte maximale Effektstärke^{43–45} oder eine veränderte Affinität des Rezeptors für den jeweiligen Liganden^{35,38,44,46,129,132,139} werden. Solche Messungen können beispielsweise durch Vergleich der Kinetiken bei Agonistenentzug und Repolarisation erreicht werden⁴⁵. Durch Untersuchung einer Vielzahl an Liganden mit strukturell unterschiedlichen Merkmalen muss weiterhin geklärt werden, ob die beobachteten Membranpotenzial-abhängigen Effekte bei Stimulation des Rezeptors mit unterschiedlichen Liganden im gleichen Maße auftreten.

Die Charakterisierung der spannungsabhängigen Rezeptormodulation sollte im Idealfall nicht nur auf Rezeptorebene erfolgen, was die Generierung eines intramolekularen MOR-FRET-Sensors erfordert, sondern auch anhand zahlreicher MOR-aktivierter Signaltransduktionswege, wie der G-Protein-Aktivierung oder der GRK2- oder Arrestin3-Rekrutierung durchgeführt werden. In der Literatur^{48,49,84} ist für die MOR-GRK2 – Interaktion sowie für die MOR-Arrestin – Interaktion eine ausgeprägte Liganden-Abhängigkeit in der Ausprägung der Phosphorylierung bzw. Rekrutierung beschrieben, die Morphin im Vergleich zu peptidergen Liganden wie DAMGO oder Met-Enkephalin als Agonisten mit niedriger intrinsischer Aktivität beschrieben. Daher sollte auch eine Charakterisierung ligandenabhängiger Unterschiede der MOR-vermittelten Signaltransduktion in Bezug auf Spannungsabhängigkeit durchgeführt werden.

Um die Auswirkungen einer spannungsabhängigen Rezeptormodulation auf physiologischer Ebene besser beurteilen zu können, sollten Untersuchungen auch auf der Ebene der GIRK-Kanal-Öffnung erfolgen, da diese Kanäle durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten-vermittelte Modulation zu neuronaler Hyperpolarisation führen¹¹⁰, was einen Teil der antinozizeptiven

Effekte der MOR-Aktivierung darstellt ^{64,142}. Dies sollte zunächst in transfizierten HEK 293T Zellen überprüft und anschließend die pharmakologische Relevanz der Spannungsabhängigkeit des MOR durch Messung der GIRK Ströme unter Applikation verschiedener Liganden bei Depolarisation in nativen Locus Coeruleus Schnitten belegt werden.

4. Material und Methoden

4.1 Technische Ausstattung

4.1.1 Laborausstattung

Inventar		Hersteller
Accu-jet pro		Brand, Wertheim
Cool Cell Box		Biocision, San Rafael, USA
Digitalwaage Sartorius BL 3100		Sartorius, Göttingen
DNA-Dokumentation ChemiDoc XRS		BioRad, Hercules, USA
Feinwaage Kern 770		Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Flüssig-Stickstoff Aufbewahrungsschrank Thermo Scientific Model 741		Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank Liebherr GP2716		Liebherr, Biebrach a. d. Riss
Gelelektrophorese Enduro Power Supplier		Labnet International, Edison, USA
Heiz- und Rührplatte Hei-Standard		Heidolph Instruments, Schwabach
Inkubator Binder APT line C150		Binder, Tuttlingen
Kühlschrank Liebherr profi line		Liebherr, Biebrach a. d. Riss
Laborwasseraufbereitung Ultra clear UV plus		SG, Sundern
Kühl- und Gefrierkombi Beko		Beko, Neu-Isenburg
ThermoMixer Comfort		Eppendorf, Hamburg
Laborbank – Zentrifuge	Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Mega Fuge 16 R	
Multipette plus		Eppendorf, Hamburg
Nano Photometer IMPLN		IMPLEN, München
PCR-Gerät Labcycler		Sensoquest, Göttingen
Pipetten (1 – 1000 µL) Gilson Pipetman		Gilson, Limburg-Offenheim
Schüttelapparat GFL 3015		GFL, Burgwedel
Sicherheitswerkbank ESCO Airstream		ESCO Global, Singapur
Sicherheitswerkbank LabGard ES		NuAire, Plymouth, USA
ThermoMixer Comfort		Eppendorf, Hamburg
Ultratiefkühlschrank Forma 900 Series		Thermo Scientific, Waltham, USA
Vortexer Genie 2		Scientific Industries, Bohemia, USA

Wasserbad	Memmert, Schwabach
-----------	--------------------

Tabelle 1 Übersicht über die Ausstattung des Labors

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
6-Lochplatten, Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Borosilicat Glaskapillaren GC 150 F-10	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Feindosierungsspritze, 1 mL	B. Braun, Melsungen
Glasfaserfilter GF/C	Whatman, Dassel
Glasplättchen (24 oder 25 mm Durchmesser)	VWR, Darmstadt
Low binding Reagiergefäß, 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Brand, Wertheim
Pipettenfüllkapillare MicroFil	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Reagiergefäß, 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Verschlusskonus, Combi-Stopper	B. Braun, Melsungen
Zellkulturschalen 6 cm, 10 cm (beschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 2 Übersicht über Verbrauchgegenstände am Messplatz

4.1.3 Ausstattung der Messplätze

Inventar	Hersteller
100x Ölimmersionsobjektiv, A-plan	Zeiss, Oberkochen
2,0 mm quadratisches Boxfilament, 2,0 mm breit	Science Products GmbH, Hofheim am Taunus
Anregungsfilter ET 436/20x	Chroma Technology, Bellow Falls, USA
Attofluor	Invitrogen, Darmstadt
BX51WI, aufrechtes Mikroskop	Olympus, Southend-on-Sea, UK
Dichroischer Strahlenteiler DCLP 460	Chroma Tehnology, Bellows Falls, USA
Dichroischer Strahlenteiler DCLP 515	Chroma Tehnology, Bellows Falls, USA
Duales Emissions-Photometrie System	Ehem. Till Photonics, Gräfelfing
Emmissionsfilter CFP D480/40M	Chroma Technology, Bellow Falls, USA
Emmissionsfilter YFP HQ535/30M	Chroma Technology, Bellow Falls, USA

Inverses Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Lichtquelle Polychrome V	Ehem. Till Photonics, Gräfelfing
Luftgepolsterter Optik-Tisch	Newport Corp., Irvine, USA
Mikromanipulator MMJ	Märzhäuser, Wetzlar
Mikromanipulator MHW	Narishige, London, UK
Perfusionssystem ALA VC3-8SP	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA
Pipettenpuller P-87	Sutter Instruments, Novato, USA
Verstärker EPC-10	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht

Tabelle 3 Übersicht über die Ausstattungsgegenstände des Messplatzes

4.1.4 Software

Software	Hersteller
ApE – A plasmid editor	M. Wayne Davis
BLAST Basic Local Alignment Search Tool	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Corel Draw 2018	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Fluorescence Spectra Viewer	https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html
GPCRDB	http://gpcrdb.org/
GraphPad Prism 7.01	GraphPad Software, La Jolla, USA
IUPHAR	http://www.guidetopharmacology.org/
Mendeley Desktop	Mendeley, London, UK
Microsoft Office 2018	Microsoft, Redmond, USA
OriginPro 2018	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Patchmaster v2x65	HEKA Elektronik Dr. Schulze, Lambrecht
Pubmed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Softwares

4.2 Reagenzien

4.2.1 Reagenzien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Substanz	Lieferant, Ort
DMEM (high glucose)	Capricorn, Ebsdorfergrund
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
Effectene® Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
FCS (fetales Kälberserum)	Capricorn, Ebsdorfergrund
G418 (Geneticin) Sulfat	PAA, Pasching
L-Glutamin (200 mM)	Capricorn, Ebsdorfergrund
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco)	Capricorn, Ebsdorfergrund
Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/mL; 10 mg/mL)	Capricorn, Ebsdorfergrund
PLL (Poly-L-Lysinhydrobromid)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin/ EDTA (0,05 % in Dulbecco's PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)	Capricorn, Ebsdorfergrund

Tabelle 5 Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Lösungen und Chemikalien

4.2.2 Reagenzien zur Verwendung in der Molekularbiologie

Substanz	Lieferant, Ort
Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Agarose-Gelelektrophorese Größenstandard (DNA-Ladders)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Promega, Madison, USA
Gel-Ladepuffer	NEB, Frankfurt a. M.
Glyzerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
5 x KCM Puffer (KCl, CaCl_2 , MgCl_2)	Selbst hergestellt
LB Mediums-Pulver nach Lennox	AppliChem, Darmstadt
LB (lysogeny broth, lysogenes Nährmedium)	Selbst hergestellt

LB-Agar-Platten	Selbst hergestellt
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
RNAse A	Roche, Basel, Schweiz

Tabelle 6 Übersicht über die in der Molekularbiologie verwendeten Chemikalien

4.2.3 Reagenzien zur Verwendung während der Messungen

Substanz	Lieferant, Ort
ATP (Adenosin 5' Triphosphat Mononhydrogen-Dinatrium-Salz)	AppliChem, Darmstadt
BSA (bovines Serum-Albumin, delipidiert)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Buprenorphin-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAMGO ([D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-Enkephalinacetatsalz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAMGO ([D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-Enkephalinacetatsalz) (LC Messungen)	Bachem, St. Helens, Großbritannien
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fentanylcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
GTP (Guanosin 5' Triphosphat Dihydrogen-Mononatrium-Salzsodium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Immersionsöl 518F	Zeiss, Oberkochen
Met-Enkephalinacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Met-Enkephalinacetat (LC Messungen)	Bachem, St. Helens, Großbritannien
Morphinhydrochlorid x 3H ₂ O	Merck, Darmstadt
Morphinsulfat (LC Messungen)	McFarlan Smith, Edinburgh, Großbritannien
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe

Tetrodotoxin

HelloBio, Bristol, Großbritannien

Tabelle 7 Übersicht über die für Messungen verwendeten Chemikalien

4.3 Plasmide

Sämtliche hier aufgeführte Plasmide wurden im pcDNA3-Vektor (vergleiche **Abbildung 5**) transferiert. Dieser Vektor ist in zahlreichen Säugetierzelllinien eingesetzt worden. Zur Steigerung des Expressionsniveaus enthält der Vektor einen Zytomegalie-Enhancer (CMV) Promoter ¹⁴³. Eine Selektion transfizierter Säugetierzellen kann mittels Geneticin (G418) oder Neomycin ¹⁴⁴ erfolgen. An der Multiple Cloning Site können über verschiedenste Restriktionserkennungsstellen die gewünschten Genabschnitte eingefügt werden. Die Aufrechterhaltung transformierter *E.coli* wird durch ein Ampicillin-Resistenzgen gewährleistet ¹⁴⁵.

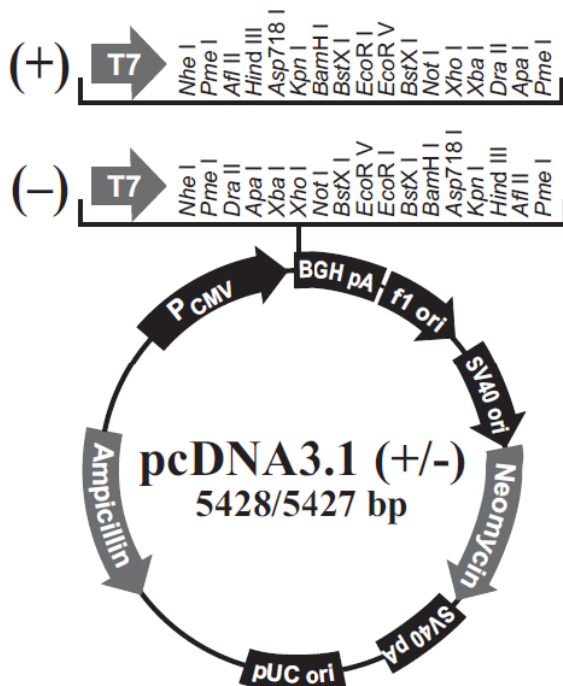


Abbildung 5: Produktinformation von Invitrogen über den pcDNA3.1 Leervektor;

Konstrukt	Spezies	Herkunft
pcDNA3 – Leervektor	n/a	Invitrogen
MOR	Ratte	Henderson, Kelley, Bristol
MOR-sYFP2	Ratte	C. Krasel, Marburg
MOR-S266-sYFP2-C-CFP	Ratte	Diese Arbeit
Si-MOR-S266-sYFP-C-CFP	Ratte	Diese Arbeit

MOR-S266-sYFP2-GG-C-CFP	Ratte	Diese Arbeit
MOR-S266-FlAsH-C-mTur2	Ratte	Diese Arbeit
MOR-S266-FlAsH-GG-C-mTur2	Ratte	Diese Arbeit
MOR-R273-sYFP2- C-mTur2	Ratte	Diese Arbeit
MOR-S266- α_{2A} -i3-YFP-C-CFP	Ratte	Diese Arbeit
MOR-K98-sYFP2-C-CFP	Ratte	Diese Arbeit
MOR-L265-sYFP2-C-mTur2	Ratte	Diese Arbeit
MOR-R179-sYFP2-C-CFP	Ratte	Diese Arbeit
MOR-V173-sYFP2-C-CFP	Ratte	Diese Arbeit
G α_i (C351I, PTX insensitiv)	Ratte	146
G α_i -YFP-C351I	Ratte	63
G α_o (C351I, PTX-insensitiv)	Ratte	63
G α_o -YFP-C351I	Ratte	63
G β_1	Mensch	63
mTur2-G β_1	Mensch	Diese Arbeit
G γ_2	Mensch	61
Arrestin3-mTur2	Rind	48
GRK2	Mensch	147
GRK2-mTur2	Mensch	148

Tabelle 8: Übersicht über die in der vorliegenden Studie verwendeten Plasmide;

4.4 Methoden

4.4.1 Zellkultur

4.4.1.1 Kultivierung von Zellen

Messungen erfolgten an einzelnen, lebenden HEK (englisch: *human embryonic kidney*) 293T Zellen. Durch Transformation einer humanen embryonalen Nierenzelle mit DNA des Adenovirus 5¹⁴⁹ wurde zunächst die immortalisierte Zelllinie HEK 293 generiert, die sich durch zuverlässiges Wachstum und unkomplizierte Handhabung auszeichnet. Durch weitere stabile Transfektion mit dem SV40 large Antigen T wurde daraus die HEK 293T Zelllinie gewonnen,

die sich durch eine Neomycin/G 418 Resistenz von den HEK 293 Zellen unterscheidet ¹⁴⁴ und in denen es ermöglicht ist, episomale Plasmide mit einem SV40-Ursprung zu replizieren ¹⁴⁵.

Um stets Zellen zur transienten Transfektion und Messung zur Verfügung zu haben, wurde stets eine 10 cm-Kulturschale mit HEK 293T Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 – 95 % Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten. Diese Zellen wurden bis zur 80-prozentigen Konfluenz kultiviert und dann passagiert. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium DMEM (plus 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, plus 1 % (v/v) L-Glutamin, plus 10 % (v/v) FCS) vollständig abgesaugt und die Zellen anschließend einmal mit 2mL PBS gewaschen. Zur Ablösung wurden die Zellen mit 1 mL Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 %, w/o Ca²⁺, Mg²⁺) für 2 min im Inkubator gehalten, bevor die Reaktion mit 10 mL DMEM beendet wurde. Das darin enthaltene FCS diente hierbei als Antitrypsin. Anschließend wurde für 2 min bei 500 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das resultierende Pellet in 5 mL DMEM resuspendiert. Je nach Bedarf wurden Zellen dann in geeigneten Kulturschalen ausgesät. Da die Intervalle des Passagierens zwischen einem und vier Tagen variierten, wurden die Zellen entsprechend im Verhältnis 1:2 bis 1:15 verdünnt ausgesät. Stabile Zelllinien wurde außerdem mit 0,5 mg/mL G418 (Geneticin) zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks behandelt.

4.4.1.2 Transiente Transfektion von Zellen

Transfektion meint eine Einbringung von plasmidischer Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. In der Regel erfolgt bei der Transfektion keine chromosomale Integration der Fremd-DNA in den HEK 293T Zellen, weshalb die plasmidische Information bei der Zellteilung wieder verloren geht ¹⁵⁰. Um eine ideale Überexpression der gewünschten Gene in den HEK 293T Zellen zu gewährleisten, wurden diese 36 h vor der Messung mit dem Effectene® Transfektionsreagenz behandelt. Zur Transfektion sollten die Zellen etwa zu 40 % konfluent und mit frischem Medium versorgt sein. Je nach Assay wurden DNA-Ansätze mit 1 – 3 µg DNA vorbereitet und mit Kondensationspuffer EC auf ein Volumen von 150 µL gebracht. Dann wurde eine dem Herstellerprotokoll entsprechende Menge Enhancer-Puffer hinzugefügt, kurz homogenisiert und 2 – 5 min inkubiert. Bei dem Transfektionsreagenz handelt es sich um ein nicht-liposomales, lipidbasiertes Transfektionsreagenz. Das Enhancer-Reagenz dient dabei der Kondensation mit der DNA. Nach der anschließenden Hinzugabe des Effectene®-Reagenz bilden sich innerhalb der 7 – 10 min Inkubationszeit spontan Mizellen in reproduzierbarer Größe aus, welche von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden können. Das resultierende Gemisch wurde nun mit 500 µL Überstand aus der Kulturschale gemischt und unter leichtem Schwenken der Schale auf die Zellen getropft. Rund 18 h später wurde die

Transfektionsreaktion durch Medienwechsel beendet und weitere 6 h später wie in 4.4.1.3 beschrieben ausgesät.

4.4.1.3 Passagieren der Zellen auf Deckgläschen

Deckgläschen wurden vor der Passage vorbereitet, indem diese in 70 % Ethanol desinfiziert und anschließend mit PBS, das in den 6-Loch-Platten vorgelegt worden war, gewaschen wurden. In einem nächsten Schritt wurde ein Tropfen Poly-L-Lysin (PLL) auf jedes Deckgläschen gegeben und dort verteilt. Nach 30 - 60 min Inkubationszeit wurde das PLL abgesaugt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Um Zellen in geeigneter Konfluenz und hinreichender Vitalität zu den Messungen verwenden zu können, wurden diese 18 h vor Beginn der Messungen wie in 4.4.1.1 beschrieben passagiert und ausgesät.

4.4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Stabile Zelllinien sowie Kulturzellen sind dauerhaft in flüssigem Stickstoff eingelagert. Hierfür wurden sie zum Einfrieren wie in 4.4.1.1 beschrieben zunächst abgelöst, zentrifugiert und dann in 1 mL DMEM, welches mit zusätzlich 100 µL FCS und 100 µL DMSO angereichert wurde, resuspendiert und anschließend in ein Kryo-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zwischenlagerung im -80 °C-Schrank über mindestens eine Nacht, bei der die Kryo-Röhrchen in einer Cool Cell® Box eingelagert waren. Mithilfe dieser Box konnte ein sanfter Temperaturabfall von 1 °C/ min gewährleistet werden. Anschließend wurden sie dann in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wird ein Röhrchen mit 10 mL DMEM auf 37 °C vorgewärmt. Die entnommenen Zellen werden dann ins vorgewärmte Medium überführt und 2 min bei 500 rpm abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird in 5 mL DMEM resuspendiert und in einer 6 cm-Schale ausplattiert. Am darauffolgenden Morgen werden nicht adhärente Zellen entfernt und gegebenenfalls das entsprechende Selektionsantibiotikum hinzugefügt.

4.4.1.5 Generierung stabiler Zelllinien

Ebenso wie in 4.4.1.2 beschrieben erfolgte eine Transfektion mit dem Effectene® Reagenz. Hier wurden allerdings HEK 293 Zellen als Empfänger der DNA verwendet. HEK 293 Zellen besitzen im Gegensatz zu den 293T Zellen keine G418/ Neomycin-Resistenz. Dies kann man sich nach Transfektion eines Plasmids mit einem solchen Resistenzgen als Selektionsmarker zu Nutze machen. Daher erfolgte ab Tag 2 nach der Transfektion die Selektion der transfizierten Zellen mit G418 (0,5 mg/ mL). Kolonien wurden in 24-Lochplatten

überführt, bis zu ausreichender Konfluenz gezüchtet und dann fluoreszenzmikroskopisch begutachtet.

4.4.2 Molekularbiologische Methoden

4.4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR konnte ein gewünschter Genabschnitt vervielfältigt werden um nach einem weiteren Verdau (Protokoll siehe 4.4.2.8) in einen gewünschten Vektor eingefügt werden zu können. Der zu amplifizierende PCR-Abschnitt wird durch den *forward* und den *reverse* Primer definiert, die jeweils komplementär zum Beginn und Ende des gewünschten DNA-Abschnitts sind. Ein typischer PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

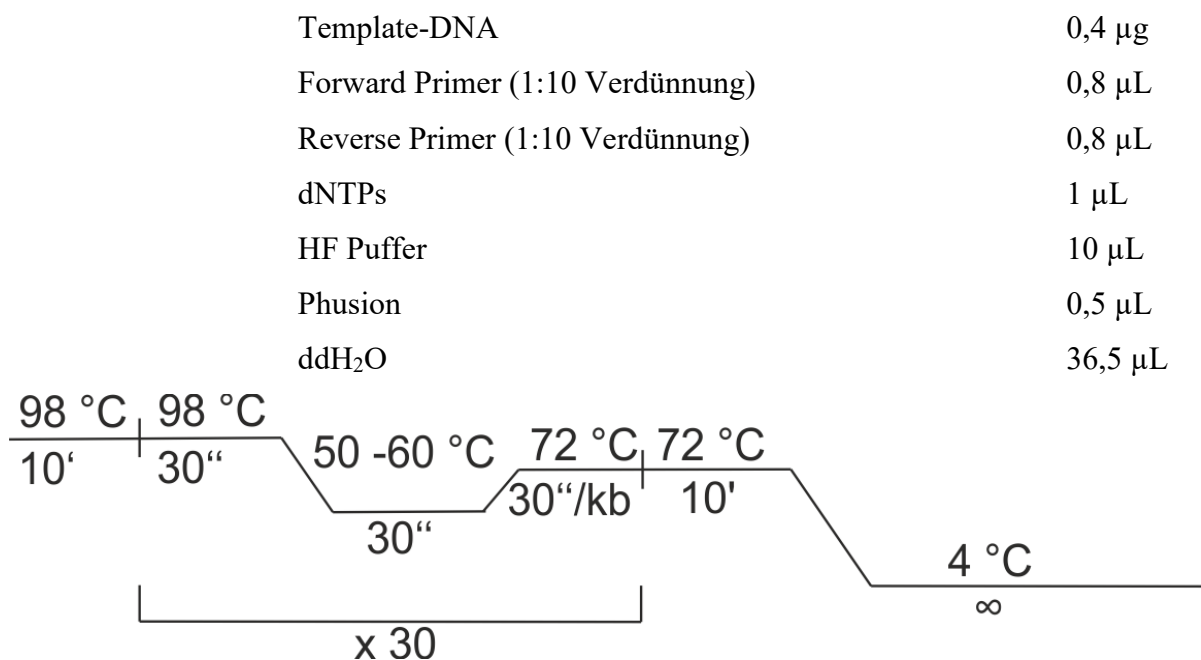


Abbildung 6: Übersicht über den zeitlichen Ablauf einer PCR mit Phusion-Polymerase;

Während der zehnminütigen Denaturierung werden die zwei komplementären Stränge voneinander getrennt. Zu Beginn eines jeden Zyklus wird dieser Schritt mit verkürzter Dauer wiederholt (vergleiche **Abbildung 6**). In einem zweiten Schritt wird die Temperatur abgesenkt um die Anlagerung der Primerfragmente zu erleichtern. Die ideale Temperatur für diesen Schritt hängt von zahlreichen Faktoren, wie dem GC-Gehalt und der Länge des Primers, sowie der verwendeten Puffer ab und wurde i.d.R. aus der Schmelztemperatur (T_m Calculator, Website von Thermo Fisher Scientific) abzüglich 3 °C errechnet ¹⁵¹. Im Anschluss erfolgt die Elongation, deren Dauer im Wesentlichen von der verwendeten Polymerase abhängt. Die verwendete Temperatur wird bestimmt durch das verwendete Enzym und liegt bei der Phusion-Polymerase bei deren Temperaturoptimum von 72 °C. In diesem Schritt liegt das zu amplifizierende Fragment wieder an das DNA-backbone angelagert vor, weshalb anschließend

ein neuer Denaturierungsschritt notwendig ist. Nach 30 Zyklen sowie einem finalen Elongationsschritt wird die Reaktion bei 4 °C gestoppt. Annähernd kann davon ausgegangen werden, dass jeder DNA-Strang in jedem Elongationsschritt verdoppelt wird. Praktisch limitiert die abnehmende Primerkonzentration jedoch die Verdopplung. Identifikation und Aufreinigung des gewünschten Fragments erfolgen anschließend mittels Gel-Elektrophorese (Protokoll siehe 4.4.2.9).

4.4.2.2 Infusion-PCR-Reaktion

Um DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Schnittstellen in Vektoren einfügen zu können wurde das InFusion® Kit nach Anweisung des Herstellers verwendet. Hierbei lag besonderes Augenmerk auf dem Design der Primer des Vektors, da diese in 5'-Richtung einen 15 bp Überlapp mit dem Insert aufweisen mussten. In einer ersten PCR nach o.g. Protokoll (siehe Kapitel 4.4.2.1) wurde das zu inserierende Fragment mittels herkömmlicher Primer amplifiziert und mittels Gel-Elektrophorese aufgereinigt (siehe Kapitel 4.4.2.9). Im Anschluss wurde der Vektor mit Primern linearisiert, welche in 5'-Richtung einen mindestens 15 bp großen Überlapp mit dem Insert-Fragment aufweisen. Es folgte eine erneute Aufreinigung mittels Gel-Elektrophorese. Mit einer Zentrifugations-Trennsäule wurde die DNA auf dem Agarose-Gel aufgereinigt und anschließend die InFusion®-Reaktion angesetzt:

PCR Insert Fragment	200 ng
Linearisierter Vektor	200 ng
InFusion HD Enzyme Premix (5x)	2 µL
ddH ₂ O	ad 10 µL

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 50 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Bei dieser ligationsfreien ein-Schritt-Reaktion werden die komplementären DNA-Abschnitte erkannt. Die Reaktion wird im Enzym Premix durch eine enthaltene 3'-Exonuclease bewerkstelligt, die für die komplementären DNA-Strangbereiche einen 5'-Überhang generiert. Die komplementären Bereiche aus Vektor und Insert können sich anschließend aneinander anlagern, enthalten aber noch *nicks* (englisch: Kerben) an den fusionierten Basen aus Insert und Vektor. Diese werden erst nach erfolgter Transformation in *E.coli* repariert. Die Transformation in superkompetente *E.coli* (Stellar Competent Cells) fand im Anschluss nach Protokoll des Herstellers (Clontech) statt.

4.4.2.3 Mutagenese

In manchen Fällen müssen einzelne Basen in einem DNA-Abschnitt verändert werden. Dies passierte in vorliegender Studie in der Regel um neue, kleine Genabschnitte einzufügen. Bei dem verwendeten Protokoll, das nach ¹⁵² modifiziert wurde, wird die Mutation unter Verwendung eines Primers eingefügt, der beidseitig etwa 15 bp Überlapp mit der Originalsequenz aufweist. Idealerweise endet der verwendete Primer mit einem Guanin oder Cytosin um eine erhöhte Bindung zwischen Primer und Template zu gewährleisten. Alle verwendeten Primer waren in HPSF- oder HPLC-Qualität aufgereinigt worden. Das Protokoll, das für die Mutagenese verwendet wurde, sah wie folgt aus:

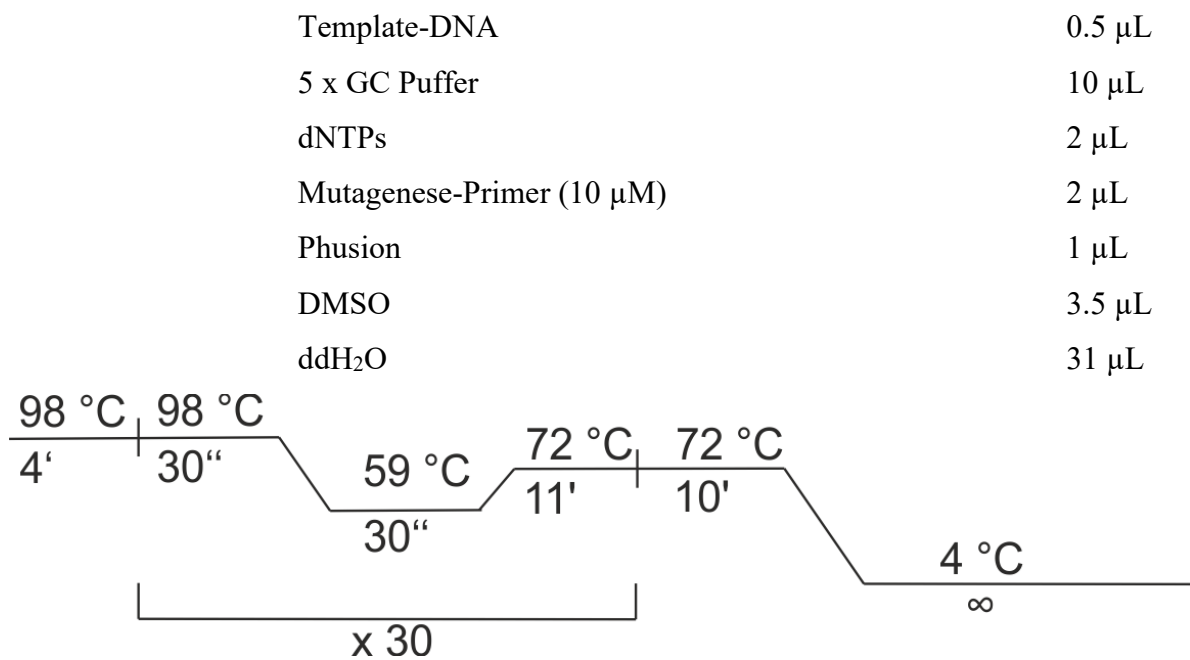


Abbildung 7: Übersicht über den Ablauf einer Mutagenese-PCR mit Phusion-Polymerase;

4.4.2.4 Herstellung von LB-Medium / LB-Agar-Platten

Die Kultur von *E.coli* erfolgte in LB Medium in Suspensionskultur oder auf LB-Agar-Platten als Festmedium. Hierfür wurde das LB-Mediums-Pulver nach Lennox zu 20 g/L in ddH₂O gelöst, im Falle der LB-Agar-Platten mit 1,5 % Agar versetzt, in 500 mL Flaschen verteilt und autoklaviert. Zum Gießen der LB-Agar-Platten wurden die Flaschen in der Mikrowelle auf 50 °C erhitzt, nach dem Abkühlen das Selektionsantibiotikum hinzugesetzt und das Medium auf Kulturschalen verteilt.

4.4.2.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Amplifikation gewünschter DNA-Konstrukte wurden diese in chemisch kompetente *E. coli* (DH5α) eingebracht. Hierfür wurden zunächst 0,1 µg des Konstruktes in 80 µL ddH₂O gelöst und mit 20 µL 5 x KCM Puffer (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂,

250 mM MgCl₂) mit 100 µL kompetenten Bakterien versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgten 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur sowie ein Hinzufügen von 1 mL LB Medium und anschließende einstündige Inkubation bei 37 °C unter Schütteln (850 rpm). Anschließend wurde das resultierende Bakterienpellet abzentrifugiert (13.300 rpm, 1 min), in 50 µL LB Medium resuspendiert und auf LB Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Nach 18 h Inkubation bei 37 °C wurden einzelne Kolonien gepickt und in LB Selektionsmedium angeimpft.

4.4.2.6 Mini-Präparation

Diese Form der DNA Amplifikation und Aufreinigung wurde zu analytischen Zwecken durchgeführt. So konnte man nach durchgeführter Klonierung mehrere Kolonien animpfen und nach erfolgter Aufreinigung im Kleinmaßstab durch einen Kontrollverdau das gewünschte Konstrukt identifizieren. Mit dieser Kolonie (Protokoll siehe 4.4.2.7) wurde dann ein Midi-Präparationsansatz angeimpft. Im Gegensatz zu einer Midi-Präparation (Protokoll siehe 4.4.2.7) werden hier keine Säulen zur Aufreinigung der plasmidischen DNA verwendet wodurch die gewonnene DNA stärker verunreinigt ist

Zunächst wurde für die Mini-Präparation eine gewünschte Anzahl an Kolonien aus Kapitel 4.4.2.5 von der Agarplatte gepickt und in einem Falconröhrchen, das mit 3 mL antibiotikahaltigem LB Medium versetzt wurde, angeimpft. Dieser Ansatz wurde 18 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und am nächsten Morgen 1 mL aus der Kolonie in Eppendorfgefäße überführt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.300 rpm wurde der Überstand abgetrennt und das resultierende Bakterienpellet in 100 µL Puffer 1 (Resuspensionspuffer + RNase A, Puffer siehe Tabelle 1) resuspendiert und anschließend 200 µL Puffer 2 (Lysepuffer) hinzugegeben. Die alkalische Lyse erfolgte bei fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und wurde durch Hinzugabe des Neutralisationspuffers (P3) gestoppt. Nach einer 20-minütigen Ruhephase auf Eis wurde für 10 Minuten bei 13 300 rpm abzentrifugiert und der Überstand in Eppendorfgefäße mit 600 µL vorgelegtem, gekühltem Isopropanol überführt. Die präzipitierende DNA wurde bei einem weiteren 10-minütigen Zentrifugationsschritt pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurde das Pellet gründlich getrocknet und anschließend mit 30 µL dd H₂O gelöst.

P 1 (Resuspensionspuffer):	P 2 (Lysepuffer)	P 3 (Neutralisationspuffer)
Tris (pH 8) 25 mM	0,2 M NaOH	60 mL Kaliumacetat (5M)
50 mM Glucose	1% SDS	11,5 mL Konz. Essigsäure (96%)
10 mM EDTA	In Reinstwasser	28,5 mL Reinstwasser
In Reinstwasser		

Tabelle 9 Übersicht über die Zusammensetzung der selbst hergestellten Puffer der Mini-Präparation;

Sämtliche Puffer wurden vor Verwendung autoklaviert.

4.4.2.7 Midi-Präparation

Der Name dieser Präparation bezieht sich lediglich auf den Größenmaßstab der Kultur. In vorliegender Studie wurde sie mithilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits durchgeführt. Diese Form der Präparation wurde gewählt um ein gewünschtes plasmidisches Konstrukt in hoher Reinheit und einer Ausbeute zu vervielfältigen, die eine Transfektion oder weitere Klonierung / Prozessierung über mehrere Jahre hinweg ermöglicht. Zur Vorbereitung der Midi-Präparation wurden 100 mL LB Medium mit *E.coli* der gewünschten Kolonie angeimpft und dieses zur Erhöhung des Selektionsdrucks mit Ampicillin angeimpft. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur bei 5.000 rpm (4 °C, 15 min) abzentrifugiert und das resultierende Pellet in 4 mL P1 Puffer resuspendiert. Die darin enthaltene RNase A zerstörte die in der Kultur enthaltene RNA. Anschließend fand die alkalische Lyse der resuspendierten Bakterien mit dem Lysepuffer P2 statt. Hierbei wurde mit dem enthaltenen Natriumdodecylsulfat die bakterielle Zellmembran zerstört und durch das stark alkalische Medium sowohl die genomische DNA, als auch die plasmidische DNA denaturiert. Nach 4 min Inkubation wurde die Denaturierung durch Hinzugabe von 4 mL Neutralisationspuffer (P3) gestoppt. Während die plasmidische DNA regenerierte, blieb die chromosomale DNA irreversibel denaturiert. Die regenerierte plasmidische DNA ging während der 20-minütigen Inkubationszeit auf Eis in den löslichen Überstand über, während die denaturierte genetische DNA zusammen mit bakteriellen Proteinen und Zellmembranbestandteilen im Präzipitat verblieb. Durch erneute Zentrifugation (30 min, 5000 rpm, 4 °C) wurde das Präzipitat abgetrennt. Es erfolgte Überführung des Überstands in eine, mit QBT-Puffer equilibrierte Anionenaustauschersäule. Dort wurde die plasmidische DNA zunächst von der Membran gebunden und durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer Reste unerwünschter zellulärer Bestandteile entfernt. Anschließend erfolgte die Elution der plasmidischen DNA mit Elutionspuffer in 3,5 mL Isopropanol. Hierbei wurde die plasmidische DNA im Eluat mit Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation für 30 min

(5.000 rpm) pelletiert. Zur Entfernung von an die DNA gebundenen Salzen, wurde das Präzipitat anschließend mit 2 mL Ethanol_{70%} gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols durch Abdampfen wurde die DNA in autoklaviertem ddH₂O gelöst und der Gehalt auf 1 µg/µL eingestellt. Lagerung der plasmidischen DNA erfolgte bei -20 °C.

4.4.2.8 Restriktionsverdau

Zur Einfügung gewünschter DNA-Fragmente in einen Vektor oder zur Überprüfung einer erfolgten Klonierung kann ein Restriktionsverdau durchgeführt werden. Hierbei erkennt das Enzym bestimmte, oft palindromische Stellen in der DNA und kann unter geeigneten Pufferbedingungen unter Erzeugung von *sticky* oder *blunt ends* dort schneiden. Die Restriktionsenzyme wurden oft aus Bakterienstämmen isoliert und sind i.d.R. nach diesen benannt ¹⁵¹. Am Beispiel des Enzyms XbaI ist die Zusammensetzung eines Verdau aufgeführt:

Plasmidische DNA	1 µg
Cut smart Puffer (10 x)	5 µg
XbaI	1 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

4.4.2.9 Ligation

Die Ligation erfolgte mittels der T4 Ligase von NEB nach dem dort empfohlenen Standardprotokoll. Wichtig für das Gelingen von Ligationen ist das Vorhandensein einer 3'OH-Gruppe und eines 5'Phosphates. Es ist generell ratsam, für den vorangegangenen Verdau (siehe Kapitel 4.4.2.8) Enzyme zu wählen, die *sticky ends* erzeugen. Das zu inserierende Fragment sollte ferner in 3 – 5-fachem molarem Überschuss im Vergleich zum Vektor eingesetzt werden um die Ligations-Wahrscheinlichkeit zu optimieren. Die Dauer der Ligation sollte sich nach den zu kombinierenden Fragmenten richten: während Fragmente mit 4 Basen Überhang in 30 min bei 37 °C ligiert werden können, sollten Fragmente mit glatten Enden über Nacht bei maximal 16 °C ligiert werden ¹⁵¹. Ligationen erfolgten stets in Anwesenheit einer Religationskontrolle. Nach erfolgter Ligation wurden 5 µL des Reaktionsansatzes und der Religationskontrolle in chemisch kompetente *E.coli* transformiert.

4.4.2.10 Gel-Elektrophorese

Die negative Ladung der Phosphatgruppen der DNA führt im elektrischen Feld zur Wanderung der DNA in Richtung Anode. Dabei werden die DNA-Fragmente nach Größe und Ladung durch das Gel aufgetrennt, das hierbei als Molekularsieb dient. Neben der Auftrennung

nach Größe zu analytischen Zwecken konnte mit dieser Technik auch eine Aufreinigung von DNA-Banden erfolgen. Dazu wurde zunächst ein Gel in folgender Zusammensetzung in einer entsprechenden Kammer gegossen:

1 x TAE Puffer: Hergestellt aus ddH₂O und 50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA: 242 g Tris-Base; 100 mL 0,5 M EDTA(pH 8,0); 57,1 mL Essigsäure; mit Wasser ad 1000 mL aufgefüllt ¹⁵¹⁾)

1 % (m/V) Agarose

Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von $\approx 0.02 \mu\text{g/mL}$;

Zur Vorbereitung wurde die DNA mit einem 6 x Ladepuffer gemischt.

Die Auftrennung der DNA-Banden erfolgte im elektrischen Feld, wobei 80 V ($\approx 10 \text{ V/cm}$) angelegt wurden. Die Fragmentlänge konnte mittels der aufgetragenen Standardleiter abgeschätzt werden. Die Dokumentation des Gelbilds erfolgte am ChemiDoc XRS Scanner mithilfe der QuantityOne 4.6.5 Software

4.4.2.11 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Nach dem Ausschneiden der gewünschten Banden aus dem Agarosegel wurde dieses zunächst in einem entsprechenden Puffer aus dem QIAQuick Gel Extraction Kit aufgeschmolzen und die negativ geladene DNA nach Protokoll des Herstellers. an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Die Elution erfolgte in ddH₂O.

4.4.2.12 Sequenzierungen

Zur Feststellung der Sequenz wurde plasmidische DNA in Konzentrationen zwischen 50 und 100 ng/ μL diluiert in ddH₂O an Eurofins Genomics geschickt und dort unter Verwendung von Standardprimern wie CMVfw oder pcDNA3rev oder selbst konzipierten Primern nach der *Cycle sequencing* Methode, modifiziert nach Sanger ¹⁵³, sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte anhand der geclippten Dateien, bei denen nur die Sequenzbereiche ausgewiesen wurden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit korrekt bestimmt werden konnten.

4.4.3 Methoden zur Messung

4.4.3.1 Vorbereitung der Agonistenlösungen

Sämtliche Agonisten wurden gewogen und in einer entsprechenden Menge ddH₂O gelöst, damit sich eine 10 mM Lösung ergab. Morphin wurde in 100 μL Aliquots in herkömmlichen Reagiergefäßen weggefroren, DAMGO und Met-Enkephalin wurden in low affinity Reagiergefäßen zu 10 μL bzw. 30 μL Aliquots bei -80 °C gelagert. Am Tag der

Messung wurden entsprechende Mengen aus den Aliquots entnommen um 10 mL der gewünschten Konzentration zu erhalten. Je nach Messung wurden verschiedene Puffer verwendet:

Extrazellulärpuffer (ohne Elektrophysiologie) bzw. Beschichtungspuffer der Deckgläschen:

NaCl	137 mM
KCl	5,4 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM

FRET in Kombination mit *whole-cell voltage-clamp*:

Um wie in ^{45,53,154} beschrieben das Auftreten Ca²⁺-abhängiger Cl⁻ Ströme zu vermeiden, welche das Fluoreszenzsignal u.U. quenchen könnten, wurden die Agonisten für diese Messungen in nominal Ca²⁺-freiem Extrazellulärpuffer (Zusammensetzung ansonsten identisch zu oben) gelöst.

GIRK-Messungen in Einwärtsrichtung (HEK 293T Zellen):

Hierzu wurde die K⁺-Konzentration extrazellulär angehoben und Na⁺ zum Ausgleich drastisch reduziert ⁴⁵:

NaCl	2,4 mM
KCl	140 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM

K⁺-Ströme wurden durch Verwendung einer 500 µM Ba²⁺-Lösung geblockt; hierfür wurde eine entsprechende Menge BaCl₂ im o.g. 140 mM K⁺-Puffer gelöst. Vor erstmaliger Verwendung der Puffer wurde die Osmolarität am Osmometer der AG Plant überprüft.

Rampentest

Zur Ermittlung der Strom – Spannungskennlinie der GIRK-Ströme in HEK 293T Zellen in Einwärts- und Auswärtsrichtung wurden die Zellen zu mehreren Messzeitpunkten einem rampenförmigen Depolarisationsprotokoll unterzogen. Hierfür wurde die Zelle zunächst für 200 msec bei -120 mV gehalten und anschließend über die Dauer von 400 msec auf +60 mV

depolarisiert und die dabei auftretenden Ströme sowohl unter Stimulation mit sättigender DAMGO-Konzentration als auch in der Abwesenheit von Agonisten (zur Ermittlung der Hintergrundaktivität) mit einem Aufzeichnungsintervall von 1 kHz gemessen. Anschließend wurden die dabei auftretenden Ströme um die Hintergrundaktivität bereinigt (im weiteren Verlauf gekennzeichnet durch ,b – a‘) und in Abhängigkeit vom Membranpotenzial dargestellt.

GIRK Messungen in Auswärtsrichtung (HEK 293T Zellen):

Hierfür wurde der o.g. Extrazellulärpuffer mit Ca^{2+} verwendet.

Intrazellulärlösung (HEK 293T Zellen):

Kaliumaspartat	105 mM
KCl	40 mM
NaCl	5 mM
MgCl ₂	7 mM
HEPES	20 mM

Es erfolgte eine erste Einstellung des pH auf 7,2 durch NaOH um eine Ausfällung des EGTA zu vermeiden.

EGTA	10 mM
GTP	0,025 mM
Na ⁺ -ATP	5 mM

Anschließend wurde der pH unter Verwendung von KOH auf 7,3 eingestellt, das Volumen final mit ddH₂O eingestellt und die resultierende Lösung unter der Zellkulturbank mittels Whatman® Filter von Staubpartikeln befreit. Eine Aliquotierung erfolgte in Feindosierungsspritzen, die mit Verschlusskappen versehen wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

GIRK Messungen in Auswärtsrichtung (LC Präparationen):

Die 230 µM dicken Schnitte wurden in eiskalter *Cutting Solution* (CS) am Vibratom generiert. Dabei wurde die CS mit 95% O₂ und 5% CO₂ angereichert und wie folgt frisch hergestellt:

NaCl	20 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	7 mM
CaCl ₂	0,5 mM
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM
Sucrose	85 mM

D-Glucose	25 mM
NaHCO ₃	60 mM

Unmittelbar nach der Präparation der Schnitte wurden diese für 1 h in künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) equilibriert, die auf 32 °C, 95% O₂ und 5% CO₂ eingestellt war und wie folgt frisch hergestellt wurde:

NaCl	126 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	2,4 mM
NaH ₂ PO ₄	1,2 mM
D-Glucose	11,1 mM
NaHCO ₃	21,4 mM
Ascorbinsäure	0,1 mM

Für die Messungen wurde das Präparat ebenfalls mit aCSF gleicher Temperatur und Gasgehalts überspült. Zur Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle wurde dem Puffer zusätzlich TTX (1 µM) hinzugefügt. Agonisten wurden in entsprechenden Konzentrationen in TTX-haltigem aCSF gelöst.

Intrazellulärlösung (LC Präparationen):

Kaliumgluconat	115 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	2 mM
HEPES	10 mM
EGTA	11 mM
Mg ²⁺ -ATP	2 mM
Na ₂ GTP	0,2 mM

Der pH wurde auf 7,3 und die Osmolarität auf 270 mOsmol eingestellt. Lagerung erfolgte bei -20 °C, Handhabung der Pipettenlösung erfolgte auf Eis.

Alle Messungen wurden nach der im Vereinigten Königreich geltenden Verordnung zu wissenschaftlichen Tierversuchen [UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986], der geltenden EU Richtlinie 1986 (86/609/EEC), den ethischen Richtlinien der University of Bath sowie den ARRIVE Richtlinien¹⁵⁵ durchgeführt.

4.4.3.2 Förster-Resonanz-Energietransfer

Für die Messung einzelner, vitaler Zellen am Mikroskop wurden 16 – 20 h vor Beginn der Messungen die 24 h zuvor transfizierten Zellen gesplittet und auf beschichtete Deckgläschen ausgesät (Protokoll siehe Kapitel 4.4.1.3).

Theoretischer Hintergrund der FRET-Messungen:

Um Konformationsänderungen innerhalb eines Proteins (intramolekulares FRET) oder Protein-Protein-Interaktionen (intermolekulares FRET) in einzelnen, lebenden Zellen direkt und damit zeitlich aufgelöst messen zu können, bedarf es einer Markierung der beobachteten Proteine. Ein häufig verwendeter Ansatz zur Beantwortung solcher Fragestellungen in GPCR-basierten Assays ist die Messung des Förster Resonanz Energietransfers (FRET) zwischen fluoreszent markierten Proteinen ¹⁵⁶. Diese Messungen basieren auf den Theorien von Th. Förster, der sich in Anlehnung an frühere Arbeiten von J. und F. Perrin mit dem quantenmechanischen Übergang der Anregungsenergien zweier gleichartiger Moleküle in Lösung befasst hat ¹⁵⁷. Praktisch passiert während einer FRET Messung folgendes: zwei Proteine, deren Interaktion beobachtet werden soll, werden mit Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzproteinen markiert. Unter bestimmten Umständen kann das angeregte Donor-Fluoreszenzprotein in einem strahlungsfreien Energieübertrag das Akzeptor-Fluoreszenzprotein anregen. Dieser Akzeptor kann unter geeigneten Bedingungen seinerseits als Donor-Fluoreszenzprotein eines weiteren Akzeptors fungieren, oder die Fluoreszenz emittieren. Um diesen beschriebenen Energieübertrag ermöglichen zu können müssen zwingend drei Bedingungen erfüllt sein ¹⁵⁸:

- **Spektraler Überlapp**, d.h., das Emissionsspektrum des Donor-Fluoreszenzproteins überlappt mit dem Anregungsspektrum des Akzeptor-Fluoreszenzproteins; als ein ideales, prototypisches FRET-Paar hat sich hier CFP – YFP etabliert (siehe auch **Abbildung 8**);
- **Geringer Abstand von Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzprotein**; die FRET-Effizienz nimmt bei Vergrößerung des Abstands der beiden Fluorophore in 6. Ordnung ab;
- **Geeignete Dipol-Orientierung**, da ein idealer Energieübergang bei paralleler Dipol-Orientierung stattfinden kann; diese Bedingung ist mit unseren Methoden nicht steuerbar und muss empirisch beurteilt werden;

In unseren Messungen wurde i.d.R. CFP und YFP ¹⁵⁹ als Donor- Akzeptorpaar gewählt. Beide Fluorophore stellen Varianten des aus *Aequorea Victoria* (Qualle) gewonnen GFPs dar ^{160,161}.

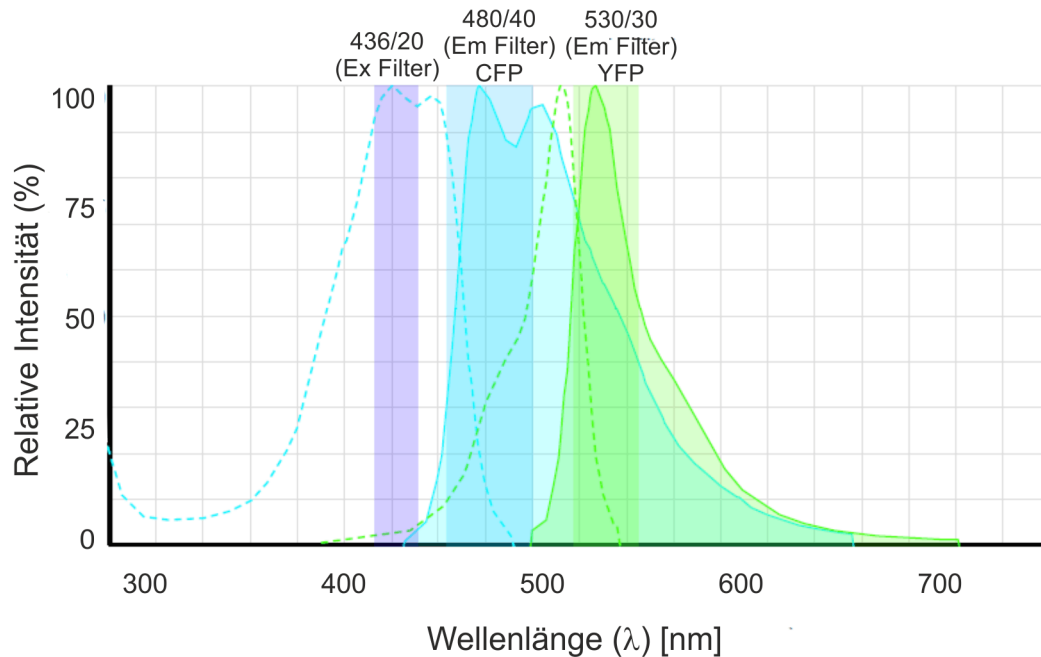


Abbildung 8: Anregungs- und Emissionsspektren von CFP und YFP;

Anregungsspektren: gestrichelte Linien, Emissionsspektren: durchgezogene Linien; Bandbreite des Anregungsfilters: violette Bande; Emissionsfilter: blaue und grüne Bande; diese Abbildung wurde mithilfe des Fluorescence Spectra Viewers der Firma Thermo Fisher Scientific erstellt.

Die Spezifikationen der verwendeten Filter sind in *Tabelle 3* aufgeführt. Der partielle Überlapp von Emissionsspektren bzw. Anregungsspektren erfordert die Bestimmung von Korrekturfaktoren, dem Durchbluten, d.h. Emission des CFPs wird fälschlicherweise durch den YFP-Emissionskanal detektiert bzw. der Falsch-Anregung¹⁵⁸, d.h. der Akzeptor wird direkt durch das Anregungswellenlänge des Donors angeregt¹⁶². Dies erfordert u.a. die Messung der Gesamtemission des YFP nach Direktanregung. In gepatchten Zellen ist diese Messung, die einen Filterwechsel und damit Erschütterung erfordert, nicht möglich.

Bildung der YFP/CFP Emission:

Aufgrund der Filterspezifikationen (D480/40M, HQ535/30 M, siehe auch 4.1.3) wurde der Quotient aus Akzeptor- über Donor-Emission zur Vereinfachung als F_{535}/F_{480} angegeben und im nachfolgenden Text als YFP/CFP Emission bezeichnet.

Durchführung der Messungen (HEK 293T Zellen):

Zu Beginn der Messungen wurde ein beschichtetes Deckgläschen mit den am Vortag ausgesäten Zellen 2-mal mit Extrazellulärpuffer gewaschen, in einem Attofluor fixiert und mit

Extrazellulärpuffer bedeckt. Anschließend wurde die Messkammer auf den Objektisch des inversen Axiovert 135 Mikroskops (weitere technische Spezifikationen des Messplatzes finden sich in *Tabelle 3*) gelegt und über duale Anregung bei 435/515 nm im Suchmodus nach einer bezüglich Zellmorphologie, Lokalisation der markierten Proteine sowie subjektiver Einschätzung der Fluoreszenzintensitäten geeigneten Zelle gesucht. Nach Platzierung der druckbetriebenen Perfusion und, im Falle elektrophysiologischer Messungen, dem Patchen der Zelle fanden die FRET-Messungen mit 2,5 Hz und einer Anregungswellenlänge von 430 nm sowie einer Belichtungszeit von 5 ms statt. Die dabei ermittelten Donor- und Akzeptoremissionsintensitäten wurden nach den Spezifikationen der verwendeten Emmissionsfilter mit F₄₈₀ und F₅₃₅ benannt und der, für die ratiometrische Auswertung relevante Akzeptor-zu-Donor-Quotient (F_{535}/F_{480}) in dieser Arbeit im weiteren Verlauf vereinfacht als ‚YFP/CFP Emission‘ bezeichnet.

4.4.3.3 Kontrolle des Membranpotentials mittels *whole-cell* Spannungsklemme

In der vorliegenden Studie wurden Konformationsänderungen innerhalb von Proteinen oder Änderungen in Protein-Protein-Interaktionen in einzelnen, lebenden Zellen zeitlich aufgelöst gemessen, während das Membranpotenzial mittels Spannungsklemme kontrolliert zu gewünschten Werten umgeklipmt wurde.

Schon 1949 entwickelte Cole¹⁶³ die Technik der Spannungsklemme an Riesenaxonen des Tintenfischs. Mitte der 1970er Jahre konnte diese Technik dann im 1-Elektroden-Messmodus etabliert werden¹⁶⁴, was die Anwendung deutlich erleichterte. In der Konfiguration der Spannungsklemme wird das Membranpotenzial stabil auf einem Zielwert gehalten und dabei die Ströme in der Zelle aufgezeichnet. Dies wird durch einen hochfrequenten Abgleich des tatsächlichen Membranpotenzials mit dem gewünschten Haltepotenzial und einer Injektion eines kompensatorischen Stroms durch den Amplifier gewährleistet. Dieser injizierte Strom repräsentiert den ionischen Leckstrom über die gepatchte Zelle mit umgekehrtem Vorzeichen¹⁶⁵.

Um im *whole-cell* Modus (englisch: ganze Zelle) eine stabile Aufzeichnung der Ströme gewährleisten zu können, muss die Pipette die Zelle möglichst zerstörungsfrei eröffnet haben. Mit der in¹⁶⁶ erklärten Technik konnte dieses Problem deutlich verbessert werden: frisch gezogene Patchpipetten wurden mit Intrazellulärlösung befüllt und mit moderatem Überdruck in die Badlösung gefahren. Bewegungen der Zellmembran zeigten die Nähe der Membran zur unter Überdruck stehenden Pipette an: Durch Applikation milden Unterdrucks lagerte sich die Membran um die Pipettenspitze an. Bei dichter Anlagerung der Membran an die Pipettenspitze

bildete sich der ‚Giga-Seal‘ (Widerstand zwischen Pipettenlösung und Badlösung im Gigaohm-Bereich; Pipette haftet an der Membran an, englisch: *cell attached*) aus. In diesem Zustand konnte die Membran schonend punktuell geöffnet werden, indem erneut Unterdruck appliziert wurde.

Dies erzeugt relativ stabile Patches, welche auch Messungen über 10 min überdauern können ¹⁶⁵. In dieser Konfiguration steht die Pipettenlösung mit der Intrazellulärflüssigkeit der gepatchten Zelle im Kontinuum, d.h. es ist davon auszugehen, dass intrazelluläre Bestandteile der vitalen Zelle, z.B. GTP durch die Pipettenlösung ausgewaschen werden. Aus diesem Grund wurde versucht, die Pipettenlösung (Protokoll siehe Kapitel 4.4.3.1) möglichst dem Intrazellulärmilieu anzugleichen.

4.4.3.4 FRET Messungen unter *whole-cell voltage-clamp* Bedingungen

Die Kombination der Aufzeichnung der YFP/CFP Emission, welche einen Indikator für konformative bzw. räumliche Veränderungen der markierten Proteine darstellt mit der Manipulation des Membranpotenzials erlaubt uns Aussagen darüber zu treffen, ob und in welchem Ausmaß diese Interaktionen bzw. dynamischen Prozesse innerhalb von Proteinen spannungsabhängig moduliert werden. Ausgehend von einem Haltepotenzial, das bei den FRET-Messungen i.d.R. bei -90 mV lag, wurde die Zellmembran auf verschiedene Potenziale umgeklummt. Dabei wurde der Verlauf des Membranpotenzials als Spannungskennlinie aufgezeichnet und die Höhen der entsprechenden Haltepotenziale anschließend in den Abbildungen gekennzeichnet. Der verwendete Verstärker erlaubte eine simultane Aufzeichnung von Leckströmen und Fluoreszenzintensitäten sowie der FRET-Ratio-Bildung.

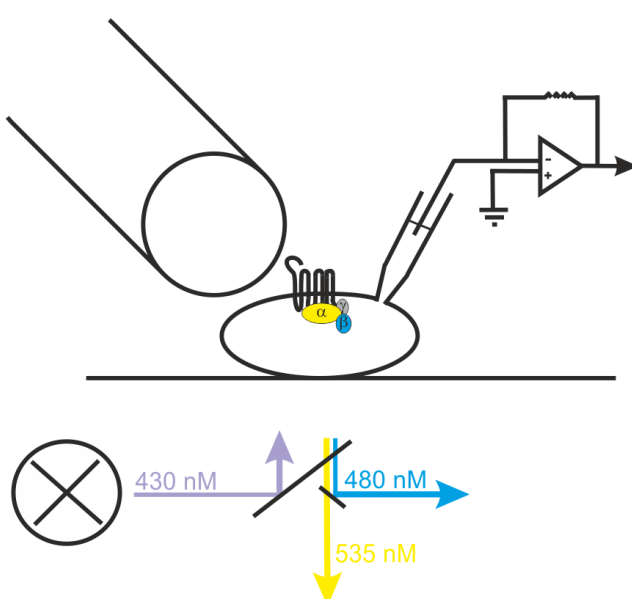


Abbildung 9: Messaufbau in der Kombination aus FRET und *whole-cell voltage-clamp*:

mit fluoreszenzmarkierten Proteinen transfizierte Zelle wird über eine Perfusion mit Agonist umspült; Messung der YFP/CFP Emission nach Anregung mit Tiefblau (430 nm) erfolgt durch Aufzeichnung von Blau (480 nm) und Gelb (535 nm) während die Zelle über die Pipette gepatcht und vom Verstärker manipuliert wird;

4.4.3.5 Messung von GIRK-Strömen unter *whole-cell voltage-clamp* Bedingungen in HEK 293 Zellen

Zur Messung der GIRK-Ströme wurde der in **Abbildung 9** gezeigte Versuchsaufbau abzüglich der Fluoreszenzanregung sowie Detektion der Lichtintensitäten verwendet.

4.4.3.6 Messung von GIRK-Strömen in LC-Präparationen

Die Messungen erfolgten an einem aufrechten Mikroskop, bei dem die Präparation in ein Bad gelegt wurde, in welchem ein konstanter Flüssigkeitsaustausch durch eine angeschlossene hydraulische Pumpe gewährleistet wurde (schematische Darstellung in **Abbildung 10**). Der konstante Fluss aus der, mit leichtem Überdruck versehenen Pipette half bei der Freilegung einzelner Zellsomata. Die Öffnung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 4.4.3.3 beschrieben.

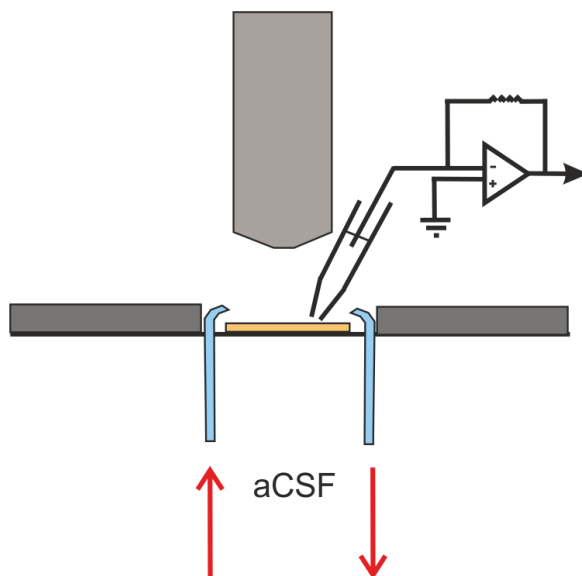


Abbildung 10: Messaufbau zur Messung der LC Präparationen.

Oben: Objektiv des aufrechten Mikroskops; rechts: Pipette und Amplifier zur Durchführung der Messungen im whole-cell Spannungsklemmen-Modus; das Präparat (orange) wurde in einer Probenkammer in einen konstanten Fluss aus temperiertem, oxygeniertem aCSF eingebracht;

4.4.4 Statistische Verfahren und Korrekturverfahren

FRET Messungen:

Die, über die Photodioden detektierten Emissionsintensitäten bei 480 nm (± 20 nm; D480/40M, weitere Filterspezifikationen siehe Tabelle 3) sowie bei 535 nm (± 15 nm; HQ535/30M) wurden mit der Patchmaster Software 2.42 aufgezeichnet und die YFP/CFP Emission als Quotient der Emissionen (siehe Kapitel 4.4.3.2) gebildet. Die Messdaten wurden anschließend als AscII-Dateien exportiert und mit Origin2018 (OriginLab Corp.) bzw. GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc.) analysiert. Die, in dieser Arbeit dargestellten Messungen stellen entweder Einzelmessungen oder Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dar. Die Anzahl der Versuchswiederholungen ist als $n = x$ angegeben.

GIRK Ströme (HEK 293T Zellen):

Die mit 1 kHz aufgezeichneten Ströme (Patchmaster Software 2.42) wurden als AscII-Dateien exportiert und mit OriginPro 2018 ausgewertet. Zum Vergleich der GIRK-Ströme zu verschiedenen Zeitpunkten wurden stets die Mittelwerte aus 2 s gebildet. Aufgrund des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden in den Messungen der Auswärtsströme die Daten mit einem Niedrigpass-FFT-Filter (englisch: *low-pass fast Fourier Transformation*) mit einer Abschneidefrequenz von 125 Hz prozessiert. Bei den Messungen in Auswärtsrichtung bei Depolarisation auf 0 mV trat in den ersten Sekunden eine reversible, kapazitive Transiente auf. Diese verzögerte den Zeitpunkt der Applikation des ersten Agonisten geringfügig, wurde sonst nicht weiter in den Auswertungen berücksichtigt. Die in dieser Arbeit dargestellten Messungen stellen entweder Einzelmessungen oder Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dar. Die Anzahl der Versuchswiederholungen ist als $n = x$ angegeben.

GIRK Ströme (LC Präparationen):

Die gepatchten Neurone wurden bei einem Haltepotenzial von -60 mV gemessen und um 12 mV für das Diffusionspotenzial korrigiert. Die aufgezeichneten Ströme wurden am Axopatch 200B Amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) mit einem Niedrigpass-Filter bei 1 kHz prozessiert und mit der WinEDR Software (University of Strathclyde, Glasgow, Großbritannien) ausgewertet. Die in dieser Arbeit dargestellten Messungen stellen entweder Einzelmessungen oder Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dar. Die Anzahl der Versuchswiederholungen ist als $n = x$ angegeben.

4.4.4.1 Bleichkorrektur

Die verwendeten Fluorophore neigen unter den Messbedingungen zu Bleichen. Daher wurde in sämtlichen FRET-Interaktionen die erhaltene Ratio durch Subtraktion einer mono-exponentiellen Funktion korrigiert. Die Durchführung ist am Beispiel der G_i -Protein-Aktivierung (**Abbildung 11**, siehe auch Kapitel 6.1) gezeigt:

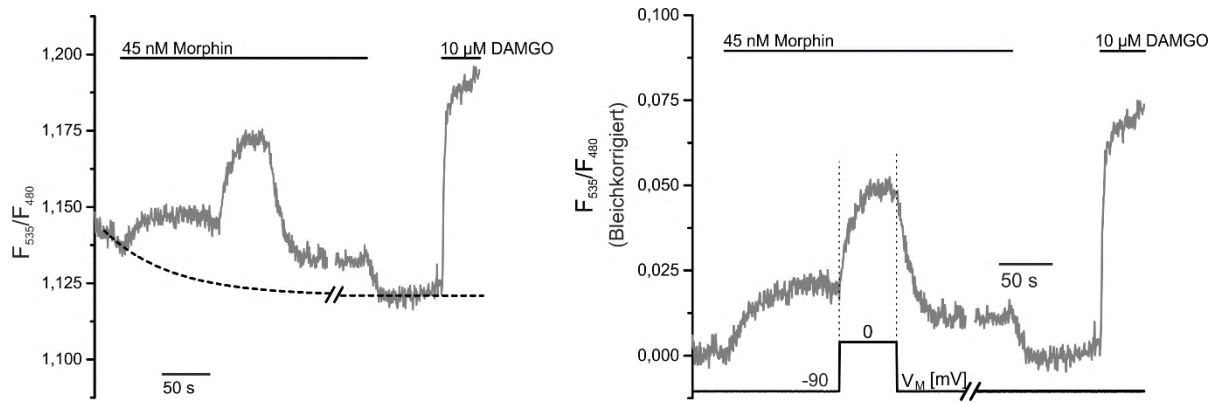


Abbildung 11: Bleichkorrekturen.

Darstellung der YFP/CFP Emission vor (links) und nach (rechts) der Bleichkorrektur an einer Messung der Interaktion zwischen G_{i1} -YFP und $mTur2$ - $G\beta_1$ in Anwesenheit des MOR-wt und $G\gamma$. Die zur Korrektur verwendete Exponentialfunktion ist als gestrichelte Linie dargestellt;

4.4.4.2 Normalisierungen

Diese Rechenoperationen wurde durchgeführt um Messungen identischer Interaktionen mit unterschiedlichen FRET-Ratios vergleichbarer zu machen. Es wurden hierfür je nach Fragestellung unterschiedliche Referenzen zur Normalisierung verwendet:

Berechnung der Anpassung an die Boltzmann Funktion:

Je nach Rezeptorexpressionsniveau wurden mit der jeweiligen (nicht-sättigenden [45 nM], G_i -Aktivierungsassay; bzw. sättigenden [30 μ M], Arrestin3- bzw. - GRK2-Rekrutierung) Morphin-Konzentration unterschiedlich hohe Initialantworten bei -90 mV erzielt; hier wurden für die Berechnung zunächst die bleichkorrigierten FRET-Ratio-Werte um die Initialantwort (bei -90 mV) subtrahiert und anschließend sämtliche spannungsinduzierte Änderungen in der FRET-Ratio auf die FRET-Änderung bei 0 mV normalisiert. Somit konnte erreicht werden, dass die spannungsvermittelten FRET-Änderungen zwischen -90 mV und 0 mV im Bereich zwischen 0 und 1 lagen; die Anpassung an die Boltzmann Funktion erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism 8 mit folgender Formel:

$$R = R_{min} + \frac{R_{max} - R_{min}}{1 + \exp\left(\frac{V_{0,5} - V}{k}\right)},$$

hierbei bezeichnet R die jeweilige Veränderung in der YFP/CFP Emission, R_{min} und R_{max} stellen die minimale bzw. maximale YFP/CFP Emissions-Änderung im jeweiligen Assay dar, $V_{0,5}$ bezeichnet das Membranpotenzial, bei dem der halbmaximale depolarisationsvermittelte Effekt auftritt, V das zu R korrespondierende Membranpotenzial und k stellt den Steigungsfaktor in der erhaltenen Funktion dar;

Der Steigungsfaktor wird wiederum für die Berechnung der Elementarladungsverschiebung (z), die sich näherungsweise wie folgt berechnet, benötigt:

$$z = \frac{-26}{k}$$

Berechnung von Kinetiken:

Nach erfolgter Bleichkorrektur wurde die Messung auf den Durchschnittswert im Plateau vor dem kinetisch untersuchten Prozess (Zurückklemmen bzw. Auswaschen) normalisiert und wie in Kapitel 4.4.4.3 besprochen analysiert;

Vergleich der Amplituden (Arrestin- oder GRK2-Rezeptorinteraktion):

Die bleichkorrigierten Messungen der Liganden-induzierten Interaktion wurden auf den Durchschnittswert der Maximalamplitude im Plateau normalisiert. Hierfür wurden für die GRK2-, bzw. Arrestin-Interaktionen 10 μ M und für die GIRK-Messungen 30 nM DAMGO verwendet;

Vergleich der spannungsinduzierten Veränderungen im GIRK-Strom in HEK Zellen:

Es wurde die Responsivität der GIRK-Ströme bei Gabe nicht-sättigender Opioid-Konzentrationen (4,5 bzw. 22,5 nM Morphin) mit der Antwort bei Applikation sättigender DAMGO-Konzentration (30 bzw. 300 nM) verglichen. Da die individuelle Antwort der einzelnen Zellen auf die nicht-sättigende Morphinkonzentration je nach Rezeptorexpression unterschiedlich stark ausfiel, wurden nur solche Zellen in die Auswertung eingeschlossen, in denen die Morphin-Antwort bei Haltepotenzial (-90 bzw. -50 mV) bei maximal 30 % des maximalen, durch sättigende Opioid-Konzentration erzeugten GIRK-Stroms lag. Dies sollte verhindern, dass bei depolarisationsinduzierter Rezeptoraktivierung die Sättigung erreicht wird. Die Unterschiede in den DAMGO- (30 bzw. 300 nM) - und Morphinkonzentrationen (2,5 bzw. 22,5 nM) zwischen den Messungen der Einwärts- und Auswärtsströme resultieren aus einer zwischenzeitlich erfolgten Konzentrationsanpassung, da zwischenzeitlich eine veränderte Rezeptorendichte in der Expression vermutet wurde. Da jeweils proportionale membranpotenzialabhängige Veränderungen in der GIRK-Strom Responsivität betrachtet wurden, spielte der Betrag der verwendeten Konzentration für die Schlussfolgerungen der Studie eine untergeordnete Rolle.

Vergleich der spannungsinduzierten Veränderungen im GIRK-Strom in LC Neuronen:

Um die hohe Variabilität in der Morphin-Antwort sowie der Met-Enkephalin-Antwort, welche beide in nicht-sättigenden Konzentrationen perfundiert wurden, auszugleichen, wurde zunächst die Basislinie beim Haltepotenzial von -60 mV als Nulllinie gesetzt und danach die Morphin-induzierten Antworten (ΔI) bei verschiedenen Potenzialen auf die Morphin-Antwort bei -60 mV normalisiert. Identisches wurde für die Met-Enkephalin-induzierten Antworten durchgeführt.

4.4.4.3 Repolarisations- und Auswaschkinetiken

Mittels GraphPad Prism 8 wurden die wie in Kapitel 4.4.4.2 beschrieben vorbereiteten Daten mit folgender monoexponentieller Funktion gefittet:

$$Y = (Y_0 - Plateau) * e^{\left(-\frac{k_{off}}{x}\right)} + Plateau;$$

Hierbei stellt Y_0 den normalisierten Messwert zum Zeitpunkt ($x = 0$ s) dar; das *Plateau* bezeichnet den Messwert, der sich nach unendlicher Zeit einstellt und k_{off} die Geschwindigkeitskonstante [s^{-1}]. Es wurde der gesamte Zeitraum vom Beginn des Auswaschens oder Zurückklemmens bis zum nachfolgenden Plateau für das Fitten einbezogen. Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten wurden nur solche Werte eingeschlossen, deren $R^2 \geq 0.8$ war. Die Darstellung der k_{off} -Werte erfolgte mittels Balkendiagrammen, die den Mittelwert \pm Standardfehler zeigen.

Die Ermittlung der Halbwertszeit $t_{0,5}$ wurde durch folgende Gleichung berechnet:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k}$$

4.4.4.4 Statistische Tests

Unter Verwendung von GraphPad Prism 8 wurde die statistische Signifikanz verschiedener Bedingungen ermittelt. Hierfür wurden gepaarte oder ungepaarte Student's t-Tests verwendet um zwei (verbundene oder nicht verbundene) Bedingungen miteinander zu vergleichen. Sollten mehr als zwei Bedingungen verglichen werden, fand die einfache ANOVA mit Tukey'schem multiplen Vergleichstest Anwendung. Unterschiede wurden als signifikant deklariert, wenn $P \leq 0,05$ errechnet wurde. Die Normalität der Datenverteilung wurde durch Verwendung eines Shapiro-Wilk-Tests überprüft und parametrische statistische Tests wurden nur bei Normalität der Daten durchgeführt.

5. Generierung eines MOR-Sensors

Im Idealfall können spannungsabhängige Effekte ohne Beteiligung weiterer, zum Teil Signal-amplifizierender Moleküle, direkt auf Rezeptorebene beobachten werden. Daher ist es, wünschenswert, die Bewegungen, die im Rezeptor selbst bei Aktivierung geschehen mithilfe eines intramolekularen FRET-Sensors darstellen zu können¹⁶⁷. Bei einem solchen Sensor befinden sich sowohl Donor- als auch Akzeptorfluorophor am Rezeptor. Eines der beiden Fluorophore wird dabei häufig am C-Terminus eingefügt¹⁶⁸, während das Zweite in räumlicher Nähe dazu an zytoplasmatischer Seite lokalisiert sein muss. Zunächst gilt es auch hier die grundsätzlichen Voraussetzungen für FRET-Paare, wie sie in Kapitel 4.4.3.2 genannt wurden, zu berücksichtigen. Da sich bei Rezeptor-Aktivierung des MOR die Transmembrandomäne 6 (vergleiche dazu **Abbildung 1**) in einer 10 Å großen, nach außen gerichtete Drehung bewegt²⁷, ist es naheliegend, das zweite Fluoreszenzmolekül in Nachbarschaft zur TM 6, an der 3. intrazellulären Schleife einzufügen. So kann im Idealfall eine größtmögliche Bewegung der beiden FRET-Partner in Relation zueinander stattfinden. Diese Herangehensweise wurde bereits an einigen Rezeptorsensoren erfolgreich erprobt^{38,169,170}. Die ideale Position für die Insertion des Fluoreszenzmoleküls innerhalb der 3. Intrazellulärschleife ist hierbei schwer vorhersagbar und muss oft empirisch ermittelt werden. Bei manchen Rezeptoren, wie den muskarinischen Rezeptoren hat man festgestellt, dass weite Teile der intrazellulären Schleife ohne Funktionsverlust gelöscht werden können^{171,172}. Beim MOR ist die 3. intrazelluläre Schleife allerdings deutlich kürzer, so dass diese Befunde nicht ohne weiteres auf diesen Rezeptor übertragbar sind.

Ein weiterer Vorteil eines solchen Sensor ist, dass CFP und YFP stets in einem gleichen stöchiometrischen Verhältnis exprimiert werden¹⁵⁸.

5.1 Generierung eines Sensors mit Insertion an Position S266

Ausgehend vom MOR-sYFP2 Konstrukt wurde hierfür in einem ersten Schritt das C-terminale CFP gegen ein YFP ausgetauscht. Dies ist eine bewährte Anordnung der Fluorophore¹⁵⁸, die ebenfalls die Option offenhält, einen möglicherweise notwendigen Austausch des Fluorophors an der 3. Intrazellulärschleife gegen ein FAsH-Bindemotiv durchzuführen¹⁷³. Nach Fusionierung des CFP an den C-Terminus wurde am Serin 266 (S266) das sYFP2 eingefügt, da die Aminosäure relativ mittig innerhalb der Schleife positioniert ist. Eine Insertion würde man i.d.R. an einer Position vermeiden, an der sich eine saure neben einer basischen Aminosäure befindet, da dies ggfs. zur Zerstörung einer ionischen Wechselwirkung führen

würde. Die Klonierung wurde mithilfe einer ligationsfreien Fusions-PCR mit dem In-Fusion®-Klonierungs-Kit (Durchführung beschrieben in Kapitel 4.4.2.2) durchgeführt.

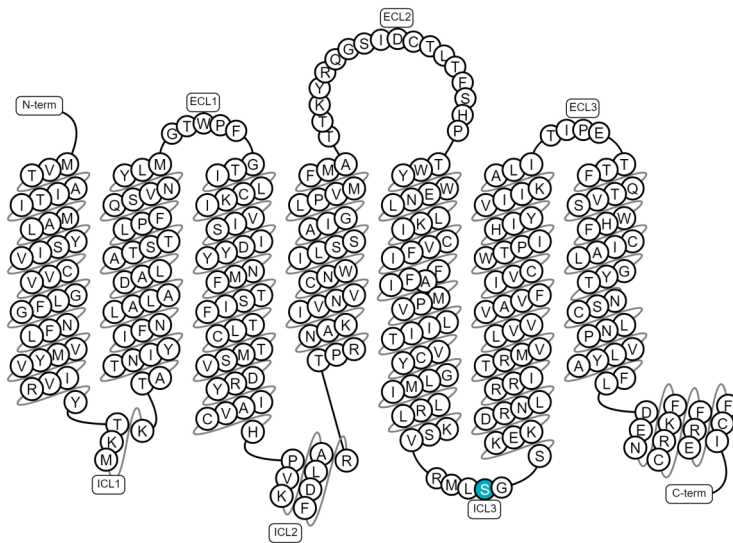


Abbildung 12: Struktur des MOR und Markierung der Insertionsstelle S266 (türkis).

generiert mithilfe [http://gpcrdb.org/protein/OPRM_RAT/];

Zum Öffnen des Vektors wurden folgende Primer verwendet:

aaaaaTTCGCATGCTATCGaccggtGTGAGCAAGGGCGAG (MOR, AgeI, sYFP2)
 aaaaaCTTTTCTTTGGAGCCgctagcCTTGTACAGCTCGTCCATG (MOR, NheI, sYFP2)

Zur Generierung des einzufügenden DNA-Fragments mit Überlapp zum Vektor wurden folgende Primer verwendet:

aaaaagctagcGGCTCCAAAGAAAAGGACA (NheI, MOR)
 aaaaaaccggtCGATAGCATGCGAACGCTCTTGAG (AgeI, MOR)

Das erfolgreiche Einfügen des Fluorophors in Position S266 wurde mit einer Sequenzierung überprüft.

5.1.1 Charakterisierung des S266 Sensor Konstrukts

Zur Überprüfung der Lokalisation des neu generierten MOR-S266-sYFP2-C-CFP Konstrukts wurden 0,5 µg plasmidischer DNA in HEK293T Zellen transfiziert und am Visitron-Setup mit 60 msec Belichtungszeit aufgenommen. Es zeigt sich eine suboptimale Membranständigkeit des Konstrukts (siehe **Abbildung 13**).

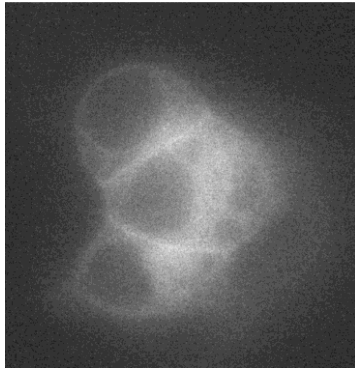


Abbildung 13: Darstellung der Lokalisation des μ OR-S266-sYFP2-C-CFP Konstruktes.

Exzitation mit Licht cyaner Wellenlänge für 60 msec; die Lokalisation erscheint überwiegend zytosolisch, mit geringfügiger membranständiger Lokalisation; Repräsentative Aufnahme aus 5 Zellen;

Überprüfung der Funktionalität mittels FRET am Elektrophysiologie-Setup zeigte zunächst keine Änderung der FRET-Ratio nach Applikation einer sättigenden DAMGO-Konzentration (10 μ M). Bei Applikation von 15 μ M DAMGO konnte schließlich dennoch eine FRET-Änderung beobachtet werden (siehe **Abbildung 14**).

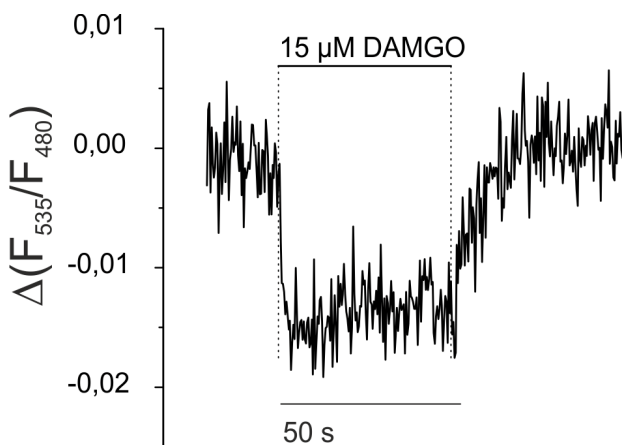


Abbildung 14: Beispielhafte Messung des μ OR-S266-sYFP2-C-CFP Konstruktes.

Stimulation erfolgte mit 15 μ M DAMGO. Rezeptoraktivierung wird durch ein Sinken der YFP/CFP Emission (bleichkorrigiert) dargestellt;

5.1.2 Generierung eines S266-Sensor-Konstrukts mit Signalsequenz

Um die Membranlokalisation zu verbessern, wurde eine N-terminale Signalsequenz eingefügt, die posttranslational erkannt und entfernt wird¹⁷⁴. Dafür wurde eine Klonierung mit der bereits erwähnten InFusion® Technik durchgeführt. Dabei wurde das MOR-S266-sYFP2-C-CFP-Konstrukt als Insert in den linearisierten Vektor Si-Venus- β 2AR-CFP¹⁷⁵ kloniert, aus dem die Teile Venus und β 2AR beim Öffnen entfielen. Es wurden folgende Primer verwendet:

Zur Öffnung des Si-Venus- β 2AR-CFP Konstruktes:

Fw: GCG GCC GCT CGA GGG (überlappt mit der NotI Schnittstelle hinter dem CFP)

Rev: CAT GGC GTC ATC ATC GTC C (überlappt mit der Signalsequenz)

Zur Generierung des Überhangs des MOR-S266-sYFP2-C-CFP-Konstruktes mit dem Vektor:

Fw: GGACGATGATGACGCCATGGACAGCAGCACCG (Si-Sequenz, MOR)

Rev: CCCTCGAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG (Vektor; MOR)

Bei der Charakterisierung des generierten Konstrukts konnte nach Applikation von 10 μ M DAMGO in 5 Zellen eine FRET-Änderung (siehe **Abbildung 15**) festgestellt werden.

5.1.3 Generierung eines S266-Sensor-Konstrukts mit verlängerter Linker-Region

Nachdem sich mit dem in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Konstrukt mit eingefügter Signalsequenz eine FRET-Änderung von rund 0,5 % gezeigt hatte, wurde versucht, dieses Konstrukt weiter zu optimieren. Wie bereits in Kapitel 5 beschrieben, zeigt der MOR im Vergleich zu anderen GPCRs, die bereits erfolgreich zu Sensoren kloniert wurden, eine besonders kurze dritte intrazelluläre Schleife ^{45,170–173}. Das Einfügen eines 240 Aminosäuren langen sYFP2-Proteins könnte die korrekte Faltung des Rezeptors beeinträchtigen. Daher wurden in einem nächsten Klonierungsschritt vor und hinter der sYFP2-Region zwei zusätzliche Glycine eingefügt (Protokoll siehe Kapitel 4.4.2.2). Hierfür wurden folgende Primer verwendet:

Zum Öffnen des Vektors:

Fw: ggcggcGGCTCCAAAGAAAAGG (Glycin-Glycin, MOR)

Rev: gccgccCGATAGCATGCGAAC

Zur Generierung des Überlapps mit dem Vektor an das einzufügende Konstrukt:

Fw: ATGCTATCGggcggcACCGGTGTGAGCAAGG (MOR, Glycin-Glycin, YFP)

Rev: CTTTGAGCCgccgccGCTAGCCTTGTACAGCTCGT

Die erfolgreiche Klonierung wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Die Charakterisierung des Konstrukts zeigte im Vergleich mit dem in 5.1.2 beschriebenen Konstrukt in etwa eine Verdoppelung der Amplitude der FRET-Änderung (siehe **Abbildung 15**).

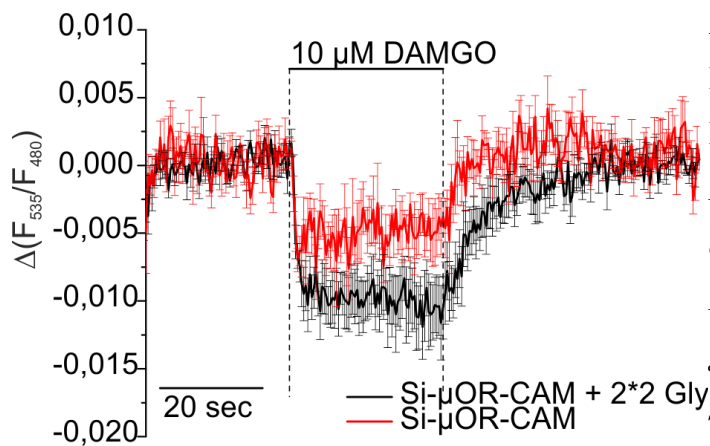


Abbildung 15: FRET Messungen der Konstrukte SI sowie SI mit Linkerregion.

Rezeptoraktivierung durch Applikation einer sättigenden Konzentration DAMGO (10 μ M). Dargestellt sind die gemittelten Messdaten von μ OR-S266-sYFP2-C-CFP (Si- μ OR-CAM; $n=5$) und μ OR-S266-sYFP2-Gly-Gly-C-CFP (Si- μ OR-CAM + 2*2 Gly; $n=3$);

5.1.4 Generierung eines S266-Sensor-Konstrukts mit FAsH-Bindemotiv

Das Einfügen eines Fluoreszenzproteins stellt einen größeren Eingriff in das Molekül dar und birgt dabei Gefahr, dessen Eigenschaften und insbesondere die Funktionalität zu beeinträchtigen¹⁷³. Bisher erschienen die FRET-Signale der klonierten YFP-Sensor-Konstrukte mit relativ schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis bei suboptimaler Membranlokalisation. Mit einer alternativen Methode zur Rezeptormakierung, bei der nach Einfügen einer kurzen Bindesequenz mit *Hairpin*-Struktur (FLNCCPGCCMEP)^{173,176} an der Insertionsstelle der Farbstoff Fluorescein im Chelatkomplex mit Arsen gebunden wird und so dem C-terminalen CFP als FRET-Partner dient, sollte der Eingriff in die Molekülarchitektur des Rezeptors gering gehalten werden. Mit dieser FAsH-Markierung (*Fluorescein Arsenic Hairpin*) wurden bereits für $A_{2A}R$ ¹⁷³, β_2AR ¹⁷⁷, M_1 -, M_3 - und M_5R ¹⁷⁰ Messungen an intramolekularen FRET-Sensoren veröffentlicht.

Es wurde ein DNA-Stück, welches das FAsH-Bindemotiv enthält und von einer AgeI und NheI Restriktionsenzym-Erkennungssequenz flankiert ist, über MWG synthetisiert. Hierfür wurden folgende Sequenzen verwendet:

Fw: CCGGTtttctaaattgtgcccgggctgctgtatggagcccG (Schnittstelle, FAsH-Bindemotiv)

Rev: CTAGCgggctccatacagcagcccgggcaacaatttagaaaA

Das MOR-S266-sYFP2-Gly-Gly-C-mTur2 Konstrukt sowie das MOR-S266-sYFP2-C-mTur2 wurden durch Restriktionsverdau mit eben genannten Enzymen an der 3. Intrazellulären Schleife geöffnet und mit den ebenso verdauten DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase (Protokoll siehe Kapitel 4.4.2.9) ligiert. Die erfolgreichen Klonierung wurde mittels Sequenzierung

überprüft. An den Messtagen erfolgte das Vorbereiten und die FLAsH-Markierung nach publiziertem Protokoll ¹⁷⁸.

Generell zeigten die FLAsH-behandelten Zellen eine runde und stark beschädigte Morphologie. In den FRET-Messungen konnte weder für MOR-S266-sYFP2-C-mTur2 (n=3), noch für MOR-S266-sYFP2-Gly-Gly-C-mTur2 (n=4) eine FRET-Änderung festgestellt werden. Da die beobachteten Veränderungen der Zellmorphologie für elektrophysiologische Messungen problematisch sind und die, für das Referenzkonstrukt A2A-CFP-Flash-C ¹⁷⁸ nur klein waren, wurden mit FLAsH keine weiteren Versuche unternommen.

5.2 Übersicht über weitere Klonierungsstrategien

Insertion YFP	Primer zur Öffnung	Primer für Überhang	Lok.	FRET
R273	Fw: aaaaaAATCTG CGCAGGATCACC Rev: aaaaaCCTGTCCT TTTCTTTGGAGC	Fw: aaaaaGCTCCAAAGAAAAGGAC AGGgtgtccGTGAGCAAGG (Vektor- Überlapp, Linker (analog zu α_{2A}), YFP) Rev: aaaaaTGCGCAGATTtgtataaccCTT GTACAGCTCGTCCATGC	Zyt.	Ø (5)
Chimär: S266 - α_{2A}- YFP (Kap. 5.3)	Fw: aaaaaATCAC CCGGATGGTGC Rev: aaaaaTAAGA TCATCAGGCCGTAACA	Fw: ACGGCCTGATGATCTTACGTA TTTACCAGATCGCCAA (MOR, α_{2A}) Rev: AGCACCATCCGGGTGATG CGTTTCTCCCGGTTTT	geringf. Mem.	Ø (4)
L265	AGCGTTCGCATGCTA ggtacc12AlanineGCTAGC TCGGGCTCCAAAGAA (MOR, KpnI, NheI, MOR)*	YFP mit fw KpnI und rev NheI	Zyt.	Ø (8)
R179	GCCCTGGATTTCCTG ggtacc12AlanineGCTAGC ACCCCCCGAAATGCC (MOR, KpnI, NheI, MOR)	YFP mit fw KpnI und rev NheI	Zyt.	Ø (4)**

Tabelle 10: Übersicht über weitere Klonierungsversuche zur Generierung eines MOR-YFP-C-CFP-Sensor-Konstruktes;

Erläuterungen:

Insertion YFP: Position, die für die Insertion des YFP-Fluorophors verwendet wurde;

Kap.: Querverweis auf das Kapitel, in dem die Strategie näher erläutert wird;

Primer zur Öffnung: Angabe der Primer, die zur Öffnung des Vektors MOR-C-CFP verwendet wurden;

*: bei diesem Konstrukt erfolgte eine Mutagenese zur Insertion zweier Schnittstellen, die zur Öffnung des Vektors dienten;

Primer für Überhang: Angabe der Primer, die zur Generierung des Überhangs der zu insertierenden YFP-Sequenz mit dem Vektor verwendet wurden

Lok.: Lokalisation; zyt. = zytosolisch; geringf. Mem.: geringfügige Membranlokalisation;

FRET-Änderung: Beschreibung der Ergebnisse; \emptyset = keine quantifizierbare FRET-Änderung bei Applikation sättigender DAMGO-Konzentration; Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gemessenen Zellen an;

** : die Aufnahmen wurden von S. Kirchhofer durchgeführt;

Die Identität aller Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft.

5.3 Erläuterungen zur Generierung eines chimären MOR-S266- α_{2A} -i3-YFP-C-CFP

Am α_{2A} -Rezeptor konnte ein funktionaler Rezeptor-Sensor generiert werden, dessen Signal-zu-Rausch-Verhältnis so gut ist, dass er bereits zur Charakterisierung in elektrophysiologischen Messungen verwendet werden konnte^{45,169}. Im Unterschied zum MOR, für den alle bisher generierten, aktivierbaren Sensoren ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis gezeigt hatten, ist die dritte intrazelluläre Schleife beim α_{2A} -Rezeptors sehr groß. Mit dem Austausch der dritten intrazellulären Schleife des MOR gegen die des α_{2A} -Rezeptors sollte die Größe der intrazellulären Schleife erhöht werden, in der Hoffnung, einer unkorrekten Proteinfaltung an dieser Stelle vorzubeugen. Die verwendeten Primer sowie die Ergebnisse der Charakterisierung des Konstrukts sind in *Tabelle 10* aufgeführt.

5.4 Bewertung der klonierten Konstrukte

Bei allen generierten Konstrukten zeigte sich eine überwiegende intrazelluläre Lokalisation der Rezeptorsensoren. Der höchste Anteil membranständiger Rezeptoren konnte bei den Konstrukten mit Insertion an S266 gefunden werden. Durch Verlängerung der Linkerregion konnte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis an diesem Konstrukt bis zu einer FRET Effizienz von etwa 1 % erhöht werden (vergleiche **Abbildung 15**). Dies wurde für eine

weitergehende Charakterisierung der Spannungsabhängigkeit allerdings als unzureichend interpretiert, weshalb keine weiteren Untersuchungen mit dem Konstrukt durchgeführt wurden.

6. Molekulare Mechanismen der Spannungsabhängigkeit des MOR-Rezeptors

Für eine Vielzahl an GPCRs wurde bereits gezeigt, dass sich ihre Aktivität unter Veränderung des Membranpotentials moduliert. Die dazu charakterisierten Rezeptoren werden von aminergen^{129,130,139}, purinergen^{41,43}, glutamatergen¹³², lipidischen^{38,131} oder cholinergen^{35,44,133,134,141} natürlichen Liganden aktiviert. Eine spannungsabhängige Rezeptormodulation stellt insbesondere an solchen Rezeptoren eine interessante Eigenschaft dar, die in stark erregbarem Gewebe vorkommen. Wie verhält sich der MOR, der erste peptidische Rezeptor, der in Folgendem unter dem Aspekt der Spannungsabhängigkeit charakterisiert werden soll, ein Rezeptor der in hoch erregbarem neuronalem Gewebe exprimiert wird und dem nicht nur zur Therapie moderater bis schwerer Schmerzen¹⁷⁹ eine entscheidende Rolle spielt, sondern auch aufgrund seiner euphorisierenden Effekte zu einer Opioidkrise in den USA geführt hat^{116,180}.

6.1 Die G-Protein-Aktivierung des MOR wird spannungsabhängig moduliert

Die antinozizeptiven Effekte des MOR resultieren aus einer Modulation der Cav2.2- und GIRK-Kanal-Leitfähigkeiten. Zu dieser Modulation kommt es durch intrazelluläre Bindung der Gβγ-Untereinheiten an die Kanäle und ist somit G-Protein-vermittelt¹¹⁰. Daher wurde ein Blick auf Depolarisations-induzierte Veränderungen an der G-Protein-Aktivierung geworfen. Aus pharmakologischer Sicht interessant war auch der Vergleich der Spannungssensitivitäten des MOR bei Bindung strukturell unterschiedlicher Liganden. Die Messungen dazu erfolgten an einem Messplatz, der ratiometrische FRET-Messungen unter *whole-cell voltage-clamp* Bedingungen ermöglichte. Die einzelnen, lebenden Zellen, die hier für die Messungen verwendet wurden, waren zuvor mit Plasmiden, die für den unmarkierten Rezeptor (MOR-wt), die gelb markierte Gα_i- oder Gα_o-Untereinheit (Gα_i C351I-YFP bzw. Gα_o C351I-YFP), die blau markierte Gβ₁-Untereinheit (mTur2-Gβ₁) und die Gγ₂-Untereinheit codieren, transfiziert worden. Wie in^{61,63} gezeigt, führt die konformationelle Umordnung bei Rezeptoraktivierung im Falle der G_i-Proteine dazu, dass es in der FRET-Ratio zu einem Anstieg im Signal kommt, während man die G_o-Aktivierung durch ein Absinken im FRET-Signal erkennt.

6.1.1 Depolarisation verstärkt die Morphin-vermittelte G-Protein-Aktivierung

Die Messbarkeit der MOR-vermittelte G-Protein-Aktivierung ist limitiert durch eine

funktionelle Rezeptorreserve¹⁸¹, d.h. nicht alle MORs werden in maximal aktiviertem Zustand benötigt um eine maximale G-Protein-Aktivierung zu erzielen. Eine Applikation nicht-sättigender Konzentrationen des Alkaloids Morphin (**Abbildung 16 A**), die etwa eine halbmaximale G-Protein-Aktivierung hervorruft, sollte daher verhindern, dass eine spannungsabhängige Aktivierungsverstärkung aufgrund von Sättigung nicht mehr in vollem Ausmaß quantifiziert werden kann. In der Tat führte Depolarisation vom Haltepotenzial (-90 mV) zu 0 mV zu einer deutlichen Verstärkung der G-Protein-Aktivierung (siehe **Abbildung 16 B, C**). Die beobachteten Veränderungen in der YFP/CFP Emission zeigten sich auch in den Einzelspuren (**Abbildung 16 B**) und waren ligandenabhängig, d.h. Depolarisation unter Pufferapplikation bewirkte keine YFP/CFP Emissions-Veränderung (**Abbildung 16 D**). Die unter Morphinapplikation beobachteten Veränderungen in der YFP/CFP Emission wurden weiter untersucht, indem Depolarisationen zu verschiedenen Membranpotenzialen erfolgten und die erhaltenen FRET-Veränderungen wie in Kapitel 4.4.4.2 beschrieben an eine sigmoidale Boltzmann-Funktion angepasst wurden. Dabei ergibt sich ein halbmaximaler Effekt durch Depolarisation bei $V_{0,5} = -29$ mV und einer Elementarladungsverschiebung (z) von $0,76 e_0$ (**Abbildung 16 E**).

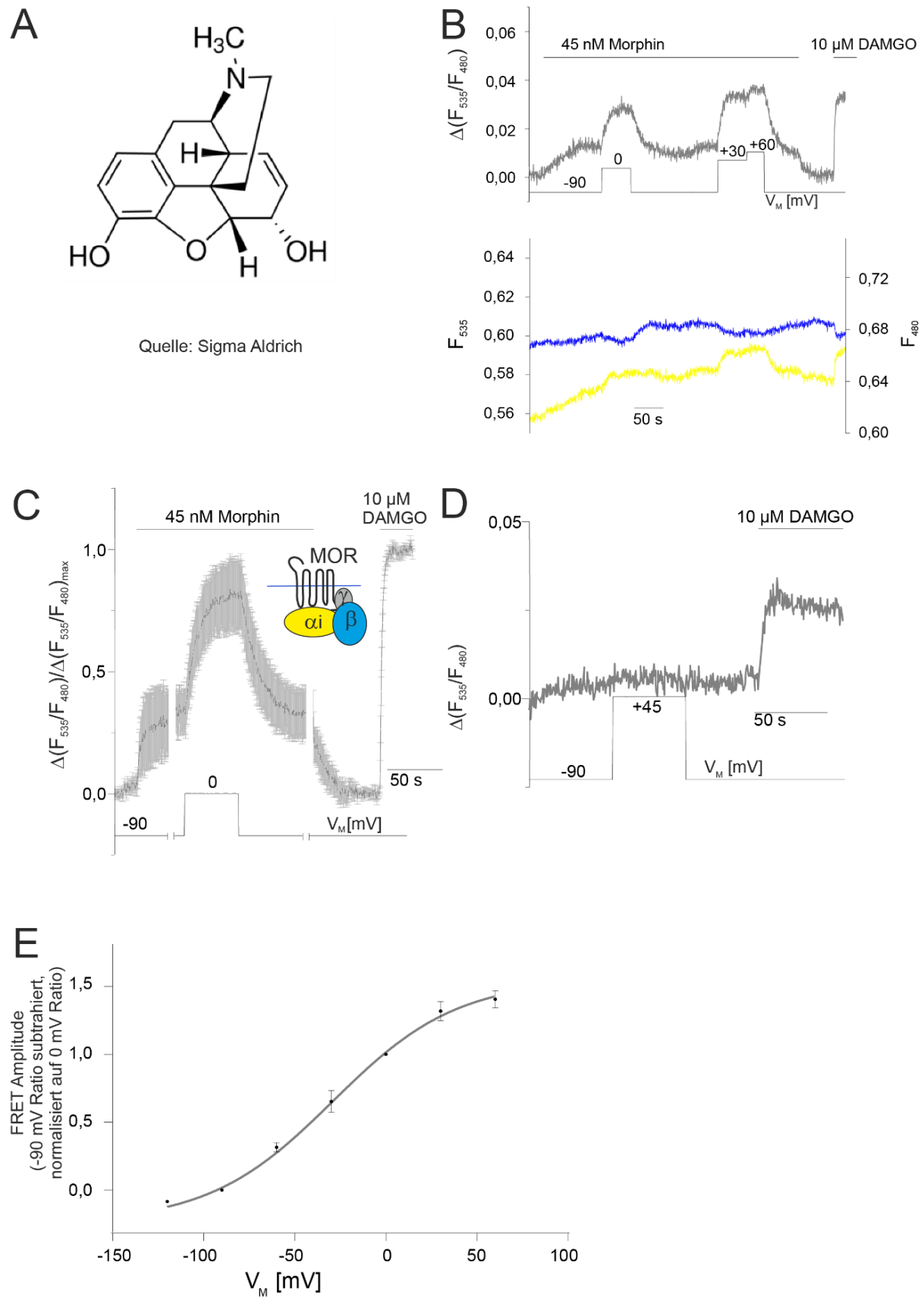


Abbildung 16: Depolarisation verstärkt die Morphin-vermittelte G-Protein-Aktivierung.

A, Struktur des Morphins, B, Beispielhafte Darstellung einer Messung der YFP/CFP Emission

(oben) und den zugehörigen Emissionen im CFP und YFP (unten) einer Zelle, die mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma$ -wt transfiziert wurde; C, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$, $G\gamma$ -wt transfiziert und mit Morphin bzw. DAMGO bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M; $n = 6$ aus 14 vergleichbaren Messungen, die jedoch einen variablen Zeitverlauf aufweisen); D, beispielhafte Darstellung der Depolarisation unter Pufferapplikation (repräsentative Zelle aus 5 Messungen), zur Kontrolle wurde nachfolgend eine sättigende Konzentration DAMGO ⁴⁹ appliziert; E, zur Ermittlung des Zusammenhangs aus Depolarisation und Verstärkung der G-Protein-Aktivierung wurden die mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma$ -wt transfizierten HEK 293T Zellen mit Morphin stimuliert und zu verschiedenen Membranpotenzialen depolarisiert; die bei -90 mV erhaltene Antwort wurde als Nullwert definiert und die erhaltenen Veränderungen der YFP/CFP Emission auf die Veränderung bei 0 mV normalisiert; die dabei erhaltenen Werte der relativen FRET Veränderung wurden an eine sigmoidale Boltzmann-Funktion angepasst ($n = 4 - 7$; $R^2 = 0,98$);

6.1.2 DAMGO-vermittelte G-Protein-Aktivierung wird moderat verstärkt durch Depolarisation

In Kapitel 6.1.1 wurden starke, spannungsabhängige Effekte auf die Morphin-vermittelte G-Protein-Aktivierung beschrieben. Natürliche Liganden des MOR weisen ein peptidisches Grundgerüst auf, das einen, von Alkaloiden distinkten Bindungsmodus vermuten ließ ^{54 3}. Daher stellte sich die Frage, ob sich spannungsabhängige Modulation des MOR in gleichem Ausmaß auch auf peptidische Liganden am MOR übertragen lassen würde. Zur Überprüfung wurde zunächst der, in der Literatur meist prototypisch verwendete Ligand DAMGO (**Abbildung 17 A**) und in Kapitel 6.1.4 der natürliche Ligand Met-Enkephalin untersucht.

Es zeigt sich bei Applikation von nicht-sättigenden Konzentrationen von DAMGO unter Depolarisation (-90 mV zu 0 mV) ebenfalls eine verstärkte G-Protein-Aktivierung (**Abbildung 17 B**). Im Gegensatz zur Morphin-Applikation (2,3-fache G-Protein-Aktivierung $\pm 0,1$), ist diese Veränderung unter Depolarisation bei DAMGO deutlich geringer ausgeprägt (1,4-fache G-Protein-Aktivierung $\pm 0,1$; **Abbildung 20 D**).

³ Der unterschiedliche Bindungsmodus opioidergender Liganden wird auch in einem Folgeprojekt durch S. Kirchhofer weiter untersucht.

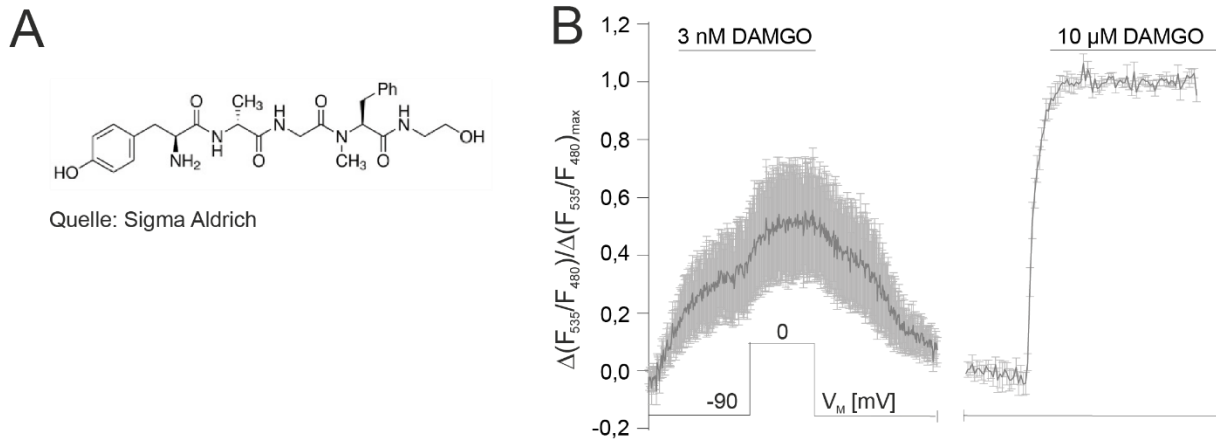


Abbildung 17: DAMGO-vermittelte G-Protein-Aktivierung wird moderat verstärkt durch Depolarisation.

A, Struktur des peptidischen Liganden DAMGO; B, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$, $G\gamma_2$ -wt transfiziert und mit nicht-sättigender bzw. sättigender DAMGO-Konzentration bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M; $n = 7$);

6.1.3 Spannungsabhängigkeit zeigt sich in gleichem Maße in der G_o - und G_i -Aktivierung

Bisher wurde gezeigt, dass sich spannungsabhängige Effekte am MOR mit dem in ⁶¹ beschriebenen G_i -Protein-Aktivierungsassay nachweisen lassen. Um zu zeigen, dass diese Effekte grundsätzlich auch mit dem ebenso vom Rezeptor aktivierten G_o -Assay ⁶³ nachweisbar sind, wurden HEK 293T Zellen mit einem Ansatz aus MOR-wt, $G\alpha_o$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ -wt transfiziert. Wie bereits in ⁶³ gezeigt wurde, führt Aktivierung des G_o -Protein Komplexes zur Verringerung der FRET-Ratio. Die, wie oben beschrieben transfizierten Zellen wurden sowohl im G_i -, als auch im G_o -Assay einem identischen Protokoll unterworfen (**Abbildung 18 A**) und zeigten in der kleinen Stichprobe keine Unterschiede im Ausmaß der spannungsabhängigen Modulation (**Abbildung 18 B**).

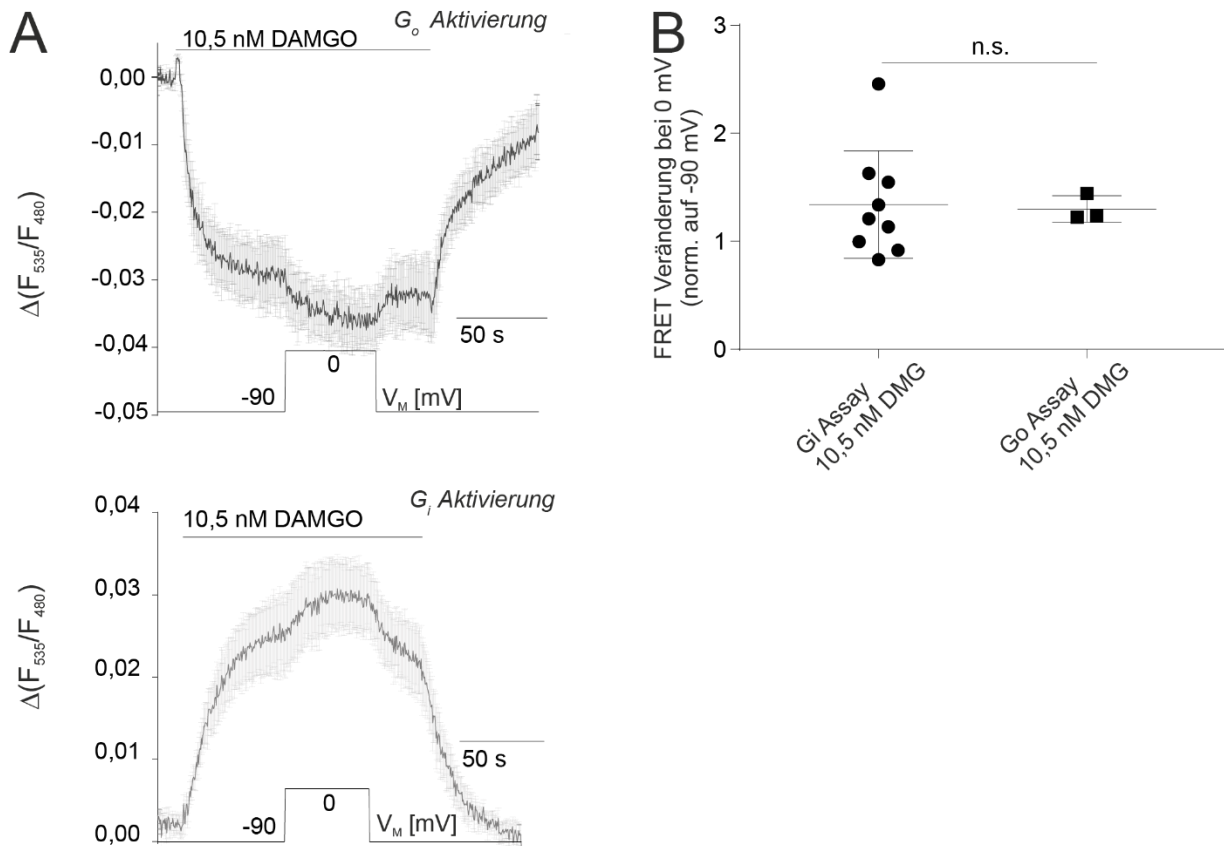


Abbildung 18: Spannungssensitivität des MOR lässt sich in gleichem Maße bei der G_o - und der G_i -Aktivierung zeigen;

A, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-wt, $G\alpha_o$ -YFP bzw. $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ -wt transfiziert und mit nicht-sättigender DAMGO-Konzentration bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M; $n = 9$ [G_i] bzw. $n = 3$ [G_o]); B, statistischer Vergleich (ungepaarter, zweiseitiger t-Test; n.s.: $P > 0,05$) der spannungsabhängigen Steigerung der G-Protein-Aktivierung unter Applikation von DAMGO (DMG) im G_i - ($n = 9$) und G_o -Assay ($n = 3$) bei einem Depolarisationsschritt von -90 mV auf 0 mV;

6.1.4 Met-Enkephalin-vermittelte G-Protein-Aktivierung reagiert insensitiv auf Depolarisation

Im Gegensatz zu DAMGO, das ein zu Stabilitätszwecken abgeändertes ¹⁸² Enkephalin darstellt, wurde hier ein natürlich vorkommender Agonist getestet (Struktur sh. **Abbildung 19 A**). Unter bisher publizierten pharmakologischen Gesichtspunkten verhält sich dieser Ligand relativ ähnlich zu DAMGO im G-Protein-Aktivierungs-Assay und in der Arrestin-Rekrutierung ⁴⁹. Zur Charakterisierung der Spannungssensitivität wurden hierfür HEK 293T Zellen mit MOR-wt, $G\alpha_o$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ -wt transfiziert. FRET Veränderungen

unter Depolarisation wurden während der etwas länger als bei DAMGO dauernden Einwaschphase des Liganden in nicht-sättigender Konzentration beobachtet. Es zeigte sich für Met-Enkephalin im Gegensatz zu DAMGO und Morphin jedoch keine offensichtliche spannungssensitive Veränderung des FRET Signals (**Abbildung 19 B**).

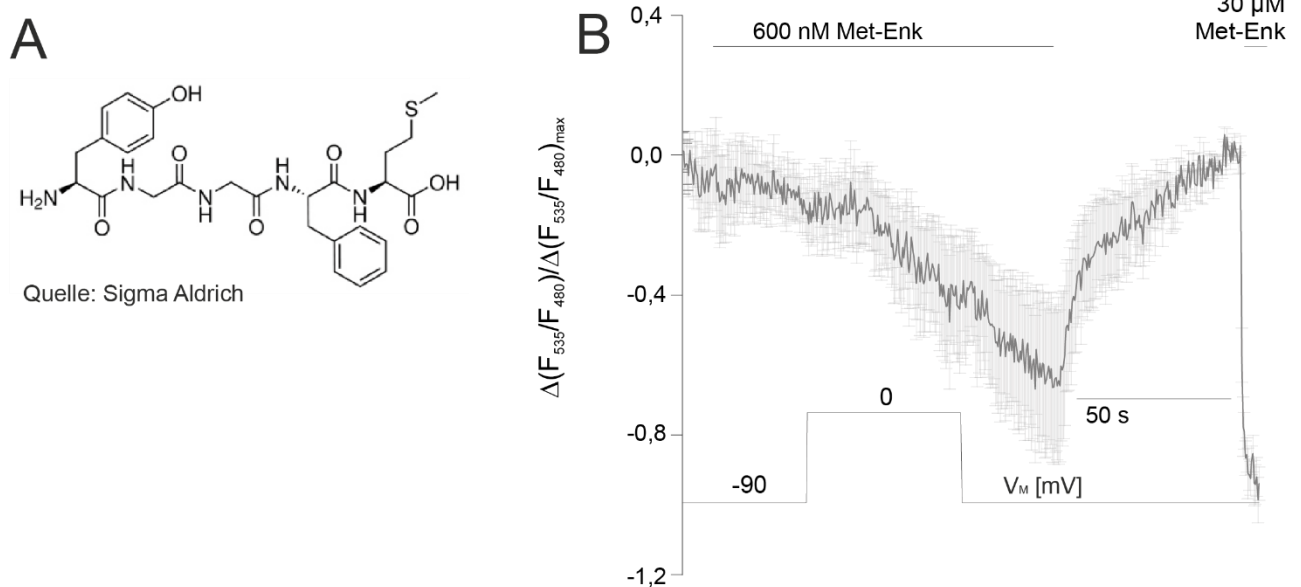


Abbildung 19: Met-Enkephalin verhält sich spannungsinsensitiv.

A, Struktur des peptidergen Liganden Met-Enkephalin; B, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-wt, G_{α_o} -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ -wt transfiziert und vor Erreichen des Plateaus bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M; $n = 5$);

6.1.5 Depolarisation führt zu einer moderaten Reduktion der Fentanyl-induzierten G-Protein-Inaktivierung

Basierend auf den Beobachtungen der ausgeprägten Liganden-spezifischen Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit am MOR sollte in weiteren Versuchen ein Zusammenhang zwischen Ligandenstruktur und Art der spannungsabhängigen Modulation am MOR hergestellt werden. Hierfür wurde Fentanyl, ein vollsynthetischer, hochpotenter Agonist am MOR mit hoher Affinität und hoher intrinsischer Effektstärke untersucht ⁴⁹, der strukturell weder Ähnlichkeit mit den alkaloidischen, Morphin-ähnlichen Liganden, noch mit den natürlichen, peptidischen Liganden zeigt (siehe **Abbildung 20 A**). In einem G_i -Protein-Aktivierungsassay an HEK 293T Zellen wurden zwei verschiedene nicht-sättigende Konzentrationen (1 nM, 5 nM) appliziert und gegen die maximale G-Protein-Aktivierung normalisiert (erzeugt durch 100 nM Fentanyl). Für beide nicht-sättigenden Konzentrationen war eine spannungsabhängige Deaktivierung sichtbar, die unter Applikation von 1 nM aufgrund

der nicht erreichten Plateauphase schwerer auszuwerten war, als unter Applikation von 5 nM (siehe **Abbildung 20 B, C**). Die beobachtete spannungsabhängige Reaktion war (für 5 nM) reversibel nach Beendigung der Depolarisation und zeigte sich auch in den Einzelspuren der Emissionen (siehe **Abbildung 20 B**). Im statistischen Vergleich zeigte der depolarisationsbedingten Veränderungen in der G-Protein-Aktivierung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Liganden Morphin, DAMGO und Fentanyl (siehe **Abbildung 20 D**). Die begonnene Charakterisierung wurde in der Masterarbeit von Sina Kirchhofer¹⁸³ in meiner Betreuung weitergeführt.

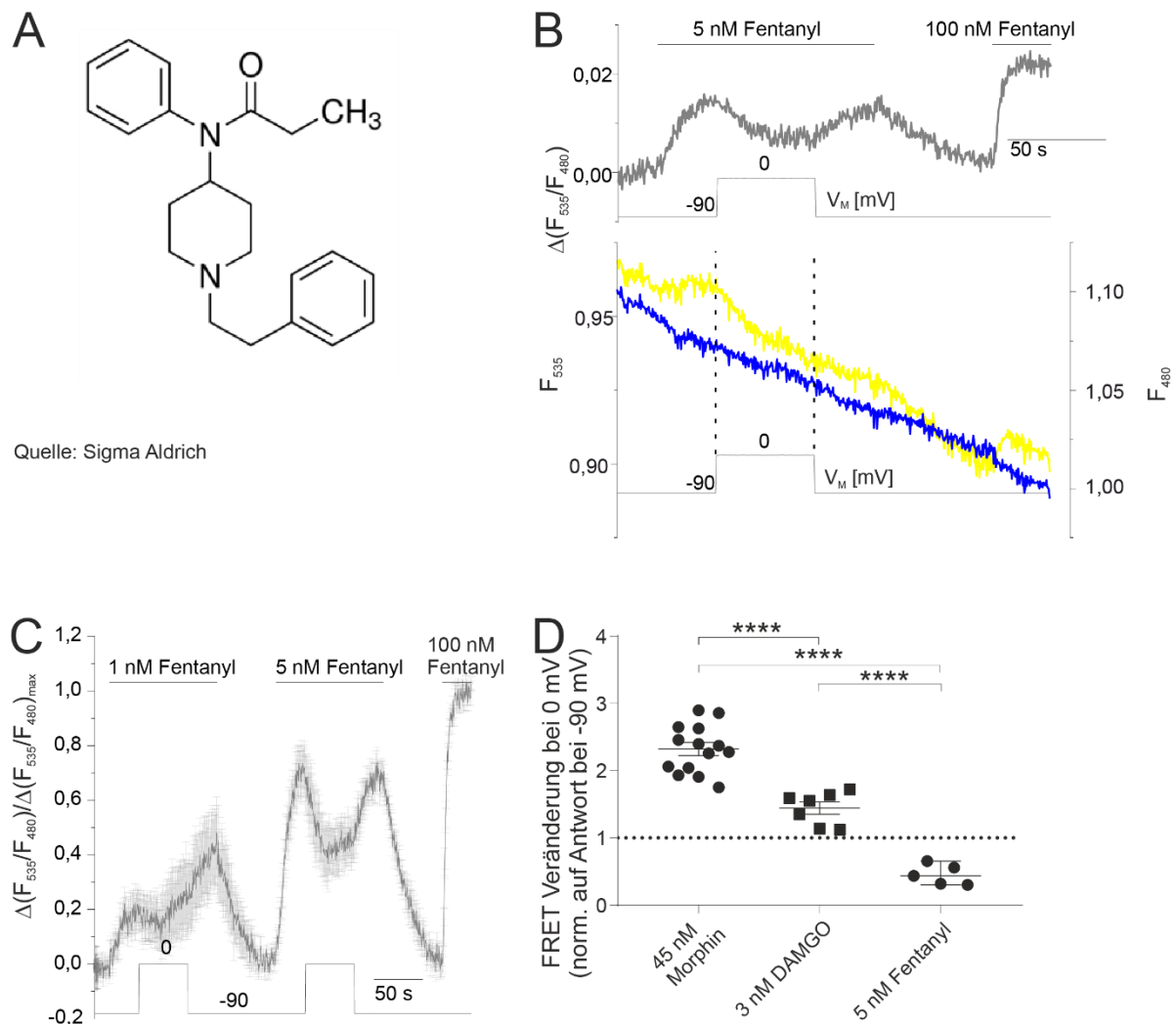


Abbildung 20: Depolarisation führt zu einer moderaten Reduktion der Fentanylinduzierten G-Protein-Aktivierung.

A, Struktur von Fentanyl. B, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$, $G\gamma_2$ -wt transfiziert und mit nicht-sättigender bzw. sättigender Fentanyl-Konzentration bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M; n = 5); C, Beispielhafte Messung der YFP/CFP Emission (bleichkorrigiert) mit

dazugehörigen Einzelemissionsmessungen für YFP (F_{535}) und CFP (F_{480}). D, Statistischer Vergleich (ungepaarter, zweiseitiger t -Test, ****: $P < 0,0001$) der spannungsabhängigen Steigerung der G-Protein-Aktivierung unter Applikation von Morphin ($n = 14$; Daten siehe Kapitel 6.1.1) DAMGO ($n = 7$, Daten siehe Kapitel 6.1.2) und Fentanyl ($n = 5$) bei einem Depolarisationsschritt von -90 mV auf 0 mV; die gestrichelte Linie deutet spannungsinsensitives Verhalten an, bei dem die Antworten bei -90 mV und 0 mV identisch sind;

6.1.6 Buprenorphin-induzierte G-Protein-Aktivierung reagiert stark sensitiv auf Veränderungen im Membranpotenzial

Buprenorphin stellt neben Morphin und Fentanyl eine weitere bedeutende Substanz aus der Pharmakotherapie moderater bis schwerer Schmerzen dar ¹¹⁰. Der Ligand weist strukturell eine enge Verwandtschaft zum alkaloidischen Liganden Morphin auf (siehe **Abbildung 21 A**), führt aber als Partialagonist im Gegensatz zu diesem in nicht-depolarisierten Zellen auch in Sättigung nur zu einer unvollständigen G-Protein-Aktivierung und einer nicht messbaren Arrestin-Rekrutierung ⁴⁹. Aus diesem Grund war es von Interesse, ob Buprenorphin-induzierte Rezeptor-Aktivität in ähnlichem Maße gesteigert wird, wie dies bei Morphin beobachtet wurde und ob dies zu einer deutlichen Steigerung der Effektstärke am Rezeptor führt. In den HEK293T Zellen, die für einen G_o -Aktivierungsassay transfiziert worden waren, wurde zunächst eine sättigende Konzentration DAMGO (300 nM) appliziert, um das Niveau der Maximalantwort abschätzen zu können. Danach wurde eine sättigende Konzentration Buprenorphin appliziert und auf $+45$ mV depolarisiert. Dabei wurde das partialagonistische Signal, das bei rund 50 % der DAMGO-induzierten Antwort lag, annähernd verdoppelt. In **Abbildung 21 B** ist lediglich eine Überlagerung zweier Messungen gezeigt, die mit 20 nM Buprenorphin stimuliert wurden. Es wurden verschiedene Konzentrationen zwischen 5 und 20 nM in der Spannungsklemme untersucht und letztlich 20 nM als geeignete Konzentration identifiziert. Im Anschluss wurde Buprenorphin im Hinblick auf Spannungsabhängigkeit von S. Kirchhofer im Rahmen der Masterarbeit ¹⁸³ in meiner Betreuung weitergehend untersucht.

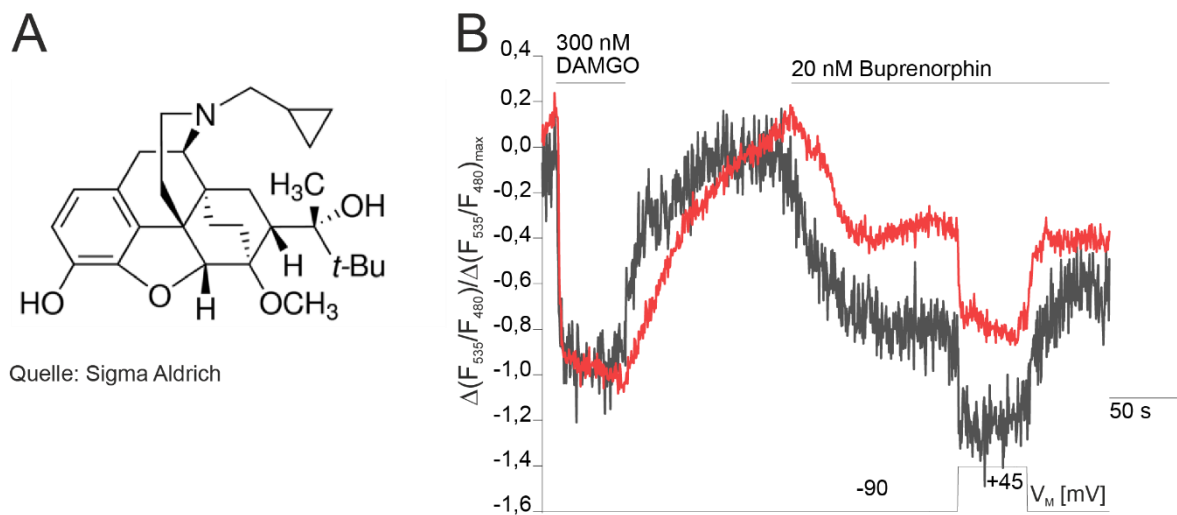


Abbildung 21: Buprenorphin-induzierte G-Protein-Aktivierung reagiert stark sensitiv auf Veränderungen im Membranpotenzial.

A, Struktur von Buprenorphin, B, Überlagerung zweier Messungen an HEK 293T Zellen, die mit MOR-wt, G_{α_o} -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ -wt transfiziert wurden. Daten wurden normalisiert auf die Maximalantwort durch 300 nM DAMGO. Depolarisation erfolgte unter Applikation sättigender Konzentration Buprenorphin;

6.1.7 Spannungsabhängige Effekte auf die G-Protein-Aktivierung zeigen sich auch bei einer raschen Abfolge kurzer Depolarisationen

Die, im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Effekte der Depolarisation auf den MOR zeigten sich insbesondere durch eine ausgeprägte Verstärkung der MOR-vermittelten G-Protein-Aktivierung unter Applikation alkaloider Liganden. Bei den beschriebenen Untersuchungen wurde stets eine Dauerdepolarisation auf ein ausgewähltes Membranpotenzial über einen längeren Zeitraum (i.d.R. 50 s) angewandt. Da sich dieser zeitliche Ablauf grundsätzlich von einem neuronalen Aktionspotenzial¹⁸⁴ unterscheidet, sollte hiermit überprüft werden, ob spannungsabhängige Effekte auch dann auftreten, wenn die Testbedingungen möglichst nahe an den physiologischen Bedingungen liegen. Dafür wurden die, mit MOR-wt, G_{α_i} -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ -wt transfizierten HEK 293T Zellen einer Abfolge von 6 kurzen Depolarisationen ausgesetzt, bei denen die gepatchte Zelle binnen 400 msec von -90 mV auf +45 mV depolarisiert, dann für 800 msec auf +45 mV gehalten und schließlich in 400 msec wieder auf -90 mV repolarisiert wurde. Die zeitliche Gestaltung des Depolarisationspulses war hierbei durch die Software des Patchmasters limitiert, die die Dauer der Depolarisationsschritte automatisch an die Belichtungsintervalle (2,5 Hz) anglich.

In den zwei durchgeführten Messungen zeigte sich deutlich, dass die Depolarisations-induzierten Auswirkungen auf die G-Protein-Aktivierung auch nach einer Abfolge von kurzen Pulsen grundsätzlich messbar sind (siehe **Abbildung 22**).

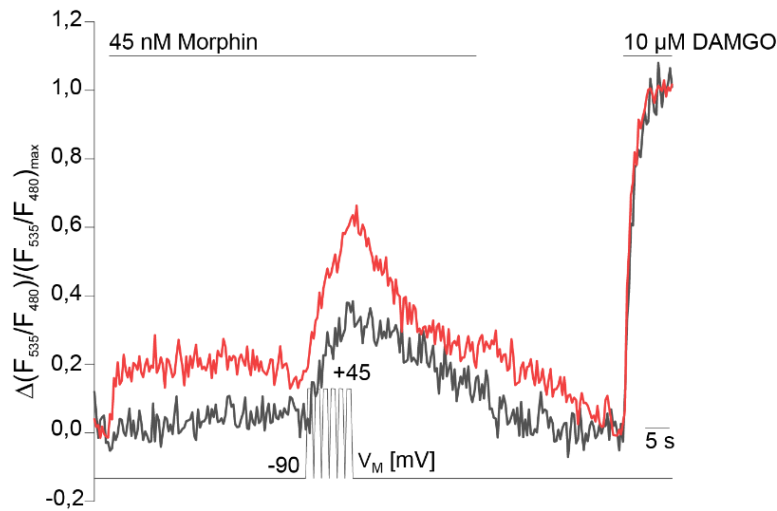


Abbildung 22: Spannungsabhängige Effekte auf die G-Protein-Aktivierung zeigen sich auch bei einer raschen Abfolge kurzer Depolarisationen.

Überlagerung zweier Messungen an HEK 293T Zellen, die mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$ und $G\gamma_2$ -wt transfiziert wurden. Daten wurden normalisiert auf die Maximalantwort durch 10 μ M DAMGO. Unter Applikation nicht-sättigender Morphin-Konzentration ⁴⁹ (45 nM) wurden eine Abfolge aus 6 kurzen Depolarisationspulsen angewandt;

6.2 Spannungsabhängige Effekte des MOR zeigen sich in einer veränderten Arrestin-Rekrutierung

Neben der G-Protein-Aktivierung stellt die Arrestin-Rekrutierung zum Liganden-aktivierten Rezeptor eine weitere wichtige Komponente der MOR-vermittelten Signaltransduktion dar ^{86,87}. Gegenstand extensiver Diskussion ist die mögliche Beteiligung der Arrestin-Rekrutierung und den Arrestin-vermittelten nachgeschalteten Effektoren ¹⁸⁵ an unerwünschten Effekten der Opioid-Therapie ^{101–103}. Ferner ist Arrestin durch die Initiierung der Bildung von Stachelsaumgrübchen an der Internalisierung, Degradierung und der Wiederverwertung des MOR beteiligt ^{95–97}. Nicht alle MOR-Liganden führen in gleichem Maße zur Arrestin-Rekrutierung ⁴⁹. Liganden mit niedriger intrinsischer Effektivität zeigen auch bei vollständiger Sättigung eine deutlich geringere Arrestin-Rekrutierung als die peptidischen Liganden Met-Enkephalin oder DAMGO ⁴⁹. Um die Arrestin-Rekrutierung mittels ratiometrischer FRET-Messungen bestimmen zu können, wurden HEK 293T Zellen transient

mit MOR-sYFP2, GRK2-wt und Arrestin3-mTur2 transfiziert und in der *whole-cell* Spannungsklemme unter Perfusion des Liganden spannungsabhängige Veränderungen in der Arrestin-Rekrutierung ermittelt.

6.2.1 Die maximale Effektstärke der Morphin-vermittelten Arrestin-Rekrutierung wird durch Depolarisation erhöht

Wie in Kapitel 6.2 bereits erwähnt, führen Liganden mit niedriger intrinsischer Effektstärke auch in Sättigung nicht zu einer maximalen Arrestin-Rekrutierung wie sie unter Applikation peptidischer Liganden zu beobachten ist ⁴⁹. Morphin ist ein solcher Ligand, der in FRET Experimenten in nicht gepatchten HEK 293T Zellen nur zu rund 15 % der DAMGO-vermittelten Antwort führte ⁴⁹. In dem dort durchgeführten Experiment wurden die transient transfizierten Zellen für etwa 400 s mit 30 μ M Morphin perfundiert und nach dem Auswaschen noch einmal 10 μ M DAMGO appliziert. Eine lediglich 15 % Arrestin-Rekrutierung in ungepatchten Zellen, also Zellen deren Membranpotenzial deutlich näher an 0 liegt als das in den Messungen verwendete Membranpotenzial von -90 mV würde für diese Messungen vermutlich noch deutlich geringere Signale als die in der Literatur beobachteten bedeuten. Daher wurde im Protokoll durch eine Prästimulation der Zellen mit DAMGO die C-terminale GRK2-vermittelte Rezeptorphosphorylierung ⁸⁴ erhöht und damit die Morphin-vermittelte Arrestin-Rekrutierung verbessert. Vor erster Applikation des Morphins erfolgte zu diesem Zweck eine Vorstimulation der HEK 293T Zellen mit einer nicht-sättigenden, schnell auswaschbaren DAMGO-Konzentration (300 nM) um die anschließende FRET-Antwort auf die 30 μ M Morphin bei -90 mV etwas zu vergrößern. In der Tat wurde so eine initiale FRET Antwort auf 30 μ M Morphin von $28 \% \pm 3 \%$ (mean \pm S.E.M.) erzielt (**Abbildung 23 A, B**), die sich auch in den CFP- und YFP-Einzelemissionsspuren zeigte (**Abbildung 23 A**) und nur in Anwesenheit eines Liganden zu beobachten waren (**Abbildung 23 C**). Vom Haltepotenzial ausgehend wurden Depolarisationsschritte zu verschiedenen Potenzialen im Bereich von -120 mV bis +60 mV durchgeführt. Dabei wurde von den erhaltenen YFP/CFP Emissionswerten die Antwort bei -90 mV subtrahiert und die Antwort auf 0 mV, welche in allen ausgewerteten Zellen als Referenzantwort gemessen wurde, zur Normalisierung herangezogen. Die auf diese Weise erhaltenen relativen Änderungen in den YFP/CFP Emissionswerten wurden erneut an eine sigmoidale Boltzmann Funktion angepasst. Für die MOR – Arrestin3 – Interaktion ergeben sich aus dem Boltzmann Fit ein $V_{0.5} = -6$ mV mit einem Elementarladungsverschiebung von $0,64 e_0$ (**Abbildung 23 D**). Da bereits in ⁴⁹ beschrieben wurde, dass für FRET-Messungen ausreichende Signale nur bei Cotransfektion der GRK2 zu beobachten waren, wurde diese in allen Messungen überexprimiert.

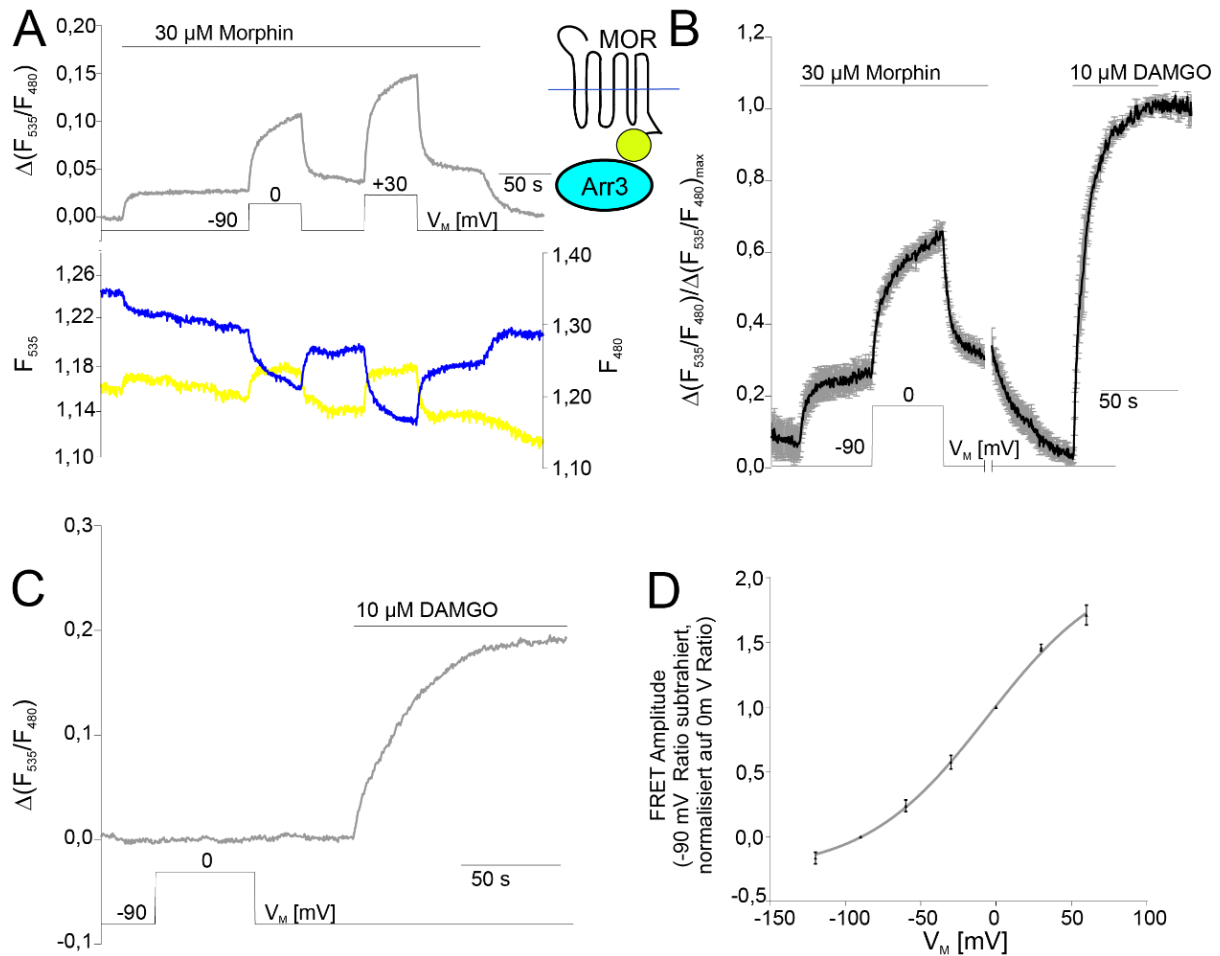


Abbildung 23: Die maximale Effektstärke der Morphin-vermittelten Arrestin-Rekrutierung wird durch Depolarisation erhöht.

A, Beispielhafte Darstellung einer Messung der YFP/CFP Emission (oben) und den zugehörigen Emissionen im CFP (blau) und YFP (gelb, unten) einer Zelle, die mit MOR-sYFP2, Arrestin3-mTur2 und GRK2-wt transfiziert wurde; *B*, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-sYFP2, Arrestin3-mTur2 und GRK2-wt transfiziert und mit sättigender Morphin- bzw. DAMGO-Konzentration bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M; $n = 6$); *C*, Beispielhafte Darstellung der Depolarisation unter Pufferapplikation (repräsentative Zelle aus 7 Messungen), zur Kontrolle wurde nachfolgend eine sättigende Konzentration DAMGO⁴⁹ appliziert; *D*, zur Ermittlung des Zusammenhangs aus Depolarisation und Verstärkung der Arrestin-Rekrutierung wurden die mit MOR-sYFP2, Arrestin3-mTur2 und GRK2-wt transfizierten HEK 293T Zellen mit 30 μ M Morphin stimuliert und zu verschiedenen Membranpotenzialen depolarisiert; die bei -90 mV erhaltene Antwort wurde als Nullwert definiert und die erhaltenen Veränderungen in der YFP/CFP Emission auf die Veränderung bei 0 mV normalisiert; die dabei erhaltenen Werte

der relativen FRET Veränderung wurden mit einer sigmoidalen Boltzmann-Funktion gefittet ($n = 3 - 6$; $R^2 = 0,99$);

6.2.2 Die Spannungssensitivität des Morphins reflektiert eine starke Veränderung in der Effektstärke

Wie bereits in Kapitel 6.2.1 erwähnt, wird die geringe maximale Effektstärke einer sättigenden Konzentration Morphin bei nicht-depolarisiertem Membranpotenzial unter Depolarisation deutlich gesteigert. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises einer Erhöhung der Effektstärke ist die kinetische Analyse der Arrestin-Rekrutierung unter Veränderung des Membranpotenzials im Vergleich mit der gleichen Interaktion unter Auswaschbedingungen. Sollten die spannungssensitiven Effekte im Wesentlichen auf eine veränderte Affinität hinweisen, so würde sich die Kinetik der beiden Effekte nicht wesentlich unterscheiden. Diese Möglichkeit der Unterscheidung der beiden Effekte wurde erstmals am α_{2A} AR angewendet⁴⁵. Dort konnte man für den Partialagonisten Clonidin bei der Rezeptoraktivierung auch bei Sättigung nur eine im Vergleich zu Noradrenalin geringe maximale Effektstärke feststellen, die sich unter Depolarisation noch weiter verringerte. Der Vergleich der Auswaschkinetik für den Liganden mit der Rückklemmkinetik zeigte in jener Publikation eine 10-fach schnellere Reaktion des Rezeptors auf Veränderungen des Membranpotenzials. Es wurde daher eine ähnliche Untersuchung für Morphin im MOR-Arrestin-Interaktionsassay durchgeführt. Dabei wurde für die Dissoziation des Komplexes unter Veränderung des Membranpotenzials ($0,14 \text{ s}^{-1} \pm 0,02$) im Vergleich zur Kinetik bei Auswaschen des Liganden ($0,07 \text{ s}^{-1} \pm 0,01$) eine zweifach schnellere Dissoziation festgestellt (siehe **Abbildung 24 A, B**). Die signifikanten Unterschiede deuten daher, ähnlich wie bei Clonidin am α_{2A} AR auf eine veränderte Effektstärke hin.

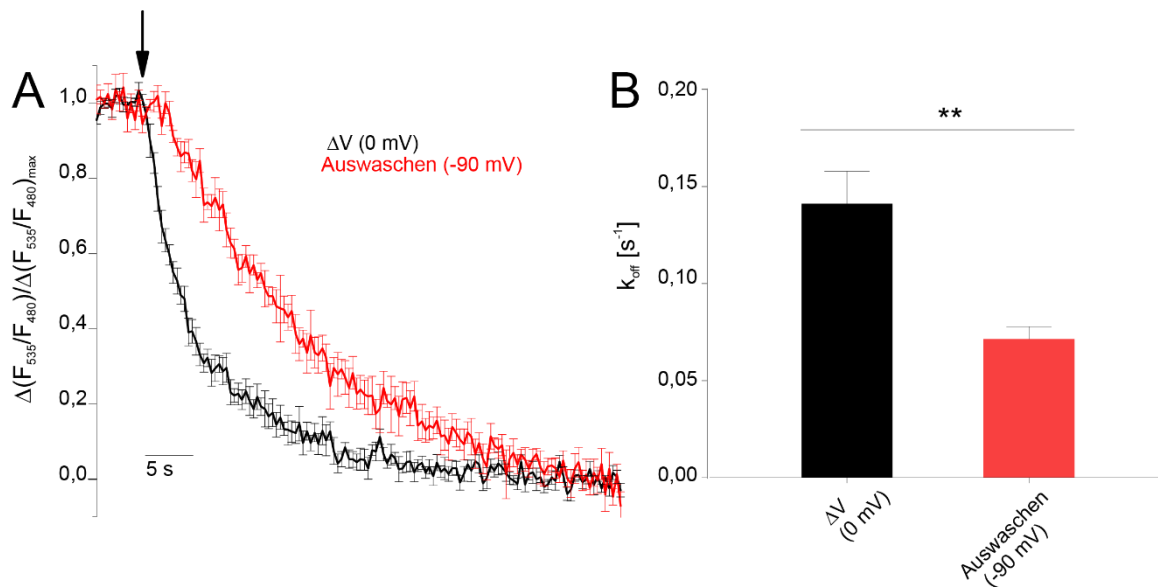


Abbildung 24: Kinetischer Vergleich des Einflusses von Depolarisation und Agonisten-Entzug auf die MOR – Arrestin – Interaktion.

A, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-sYFP2, Arrestin3-mTur2 und GRK2-wt transfiziert und mit sättigender Morphin - Konzentration stimuliert; die Auswirkung des Zurückklemmens von 0 mV auf -90 mV (ΔV , schwarz) und des Auswaschens des Agonisten (rot) auf die MOR – Arrestin3 – Interaktion wurden dargestellt. Der Pfeil stellt den Zeitpunkt des Umklemmens bzw. der Pufferapplikation dar. Die Daten wurden auf die maximale MOR – Arrestin – Interaktion nach Applikation von 10 μM DAMGO normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M; n = 7 - 8); B, statistischer Vergleich und kinetische Analyse der in A gezeigten Daten; Die Zeitkonstanten der Dissoziation (k_{off}) wurden mittels monoexponentieller Anpassung ermittelt. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test verglichen (**: $P < 0,01$);

6.2.3 Depolarisation unter DAMGO-Applikation verdeutlicht die ligandenspezifischen Unterschiede

Wie bereits in ⁴⁹ und in Kapitel 6.2.1 erwähnt, führt eine sättigende DAMGO-Konzentration (10 μM) auch in nicht depolarisierten Zellen zu einer starken Arrestin-Rekrutierung, weshalb der Ligand in dieser Studie auch als Referenz für die maximale Arrestin-Rekrutierung verwendet wurde.

Zur Untersuchung der spannungssensitiven Effekte auf die DAMGO-vermittelte MOR – Arrestin – Interaktion wurden Depolarisationsschritte unter Applikation von 10 μM DAMGO durchgeführt. Hierbei wurde ebenfalls eine Verstärkung der Arrestin – Rekrutierung beobachtet (siehe **Abbildung 25 A, B**), die im Gegensatz zu Morphin (3,0-fache Antwort \pm 0,24 der Antwort bei -90 mV) bei DAMGO statistisch signifikant geringer ausfällt (1,1-fache Antwort

$\pm 0,02$). Da DAMGO wie bereits geschildert in der Sättigung schon bei -90 mV in sehr starkem Ausmaß die Arrestin-Rekrutierung stimuliert, sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob die Spannungsabhängigkeit des DAMGO deutlicher ausfällt, wenn die Depolarisation unter nicht-sättigender Konzentration erfolgt. Dabei wurde eine Konzentration gewählt (50 nM), die eine ähnlich schwache Arrestin-Rekrutierung in nicht depolarisierten Zellen bewirkt, wie 30 μ M Morphin (eigene Vorversuche). Es wurde erneut von -90 mV auf +30 mV depolarisiert (siehe **Abbildung 25 C**) und erneut ergab der statistische Vergleich, dass die unter Applikation von 50 nM DAMGO auftretenden Veränderungen in der Arrestin-Rekrutierung (1,3-fache Antwort $\pm 0,03$ der Antwort bei -90 mV) sich auch in nicht-sättigenden Bedingungen statistisch signifikant von den Depolarisations-induzierten Veränderungen unter Applikation von 30 μ M Morphin unterscheiden (siehe **Abbildung 25 D**).

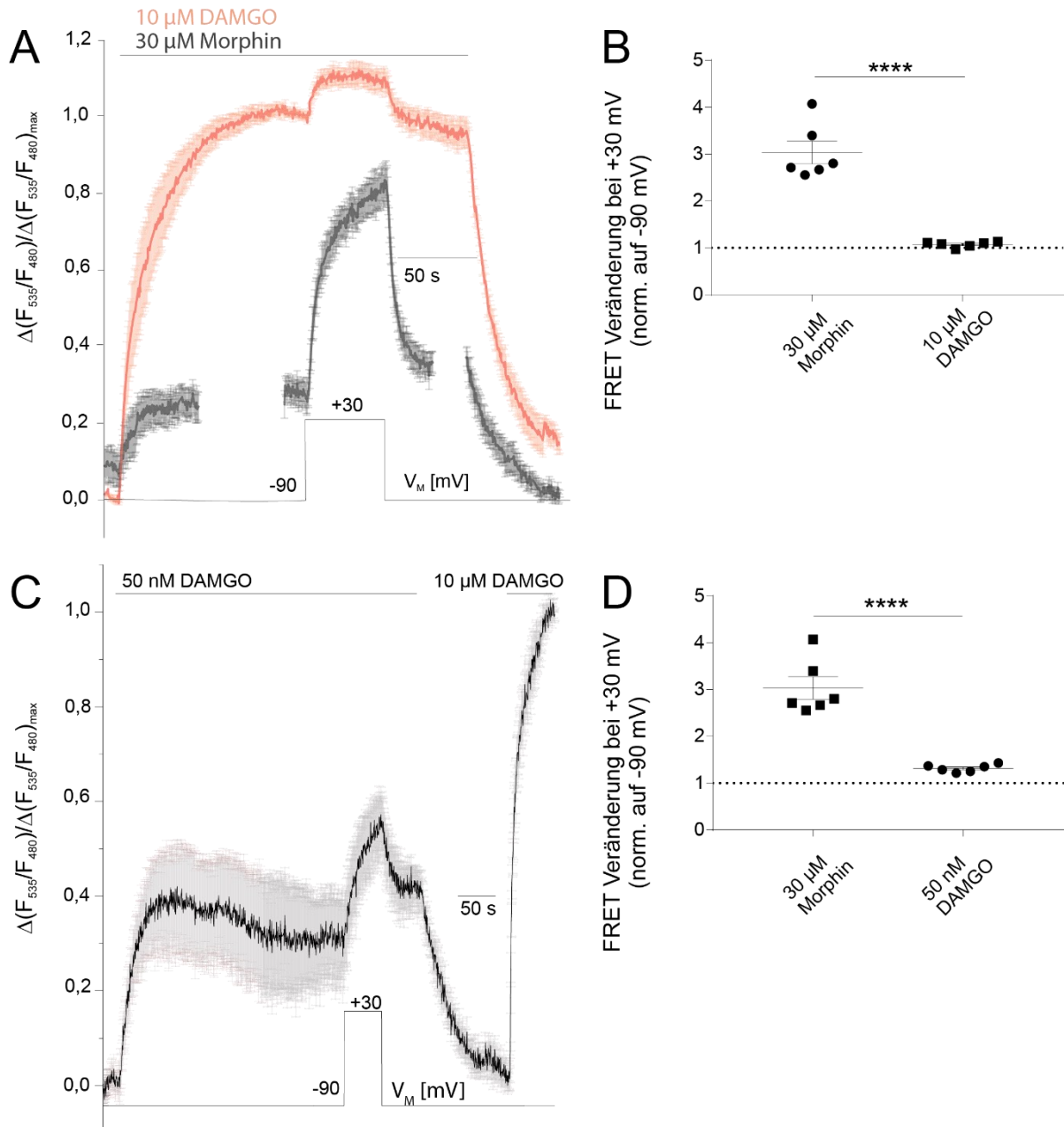


Abbildung 25: Depolarisation unter DAMGO-Applikation verdeutlicht die ligandenspezifischen Unterschiede.

A, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-sYFP2, Arrestin3-mTur2 und GRK2-wt transfiziert und mit sättigender ⁴⁹ Morphine- (grau) bzw. DAMGO-Konzentration (rot) bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert auf die DAMGO-Antwort bei -90 mV und gemittelt (mean \pm S.E.M; n = 6). B, statistischer Vergleich (ungepaarter, zweiseitiger t-Test, n = 6; ****: P < 0,0001) der spannungsabhängigen Steigerung der Arrestin-Rekrutierung unter Applikation von 30 μM Morphine oder 10 μM DAMGO bei einem Depolarisationsschritt von -90 mV auf +30 mV. Gestrichelte Linien zeigen spannungsinsensitives Verhalten an. C, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-sYFP2, Arrestin3-mTur2 und GRK2-wt transfiziert und mit 50 nM oder 10 μM DAMGO bei angegebenen

Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert auf die DAMGO-Antwort ($10 \mu\text{M}$) bei -90 mV und gemittelt ($\text{mean} \pm \text{S.E.M}$; $n = 6$). D, statistischer Vergleich (ungepaarter, zweiseitiger t -Test, $n = 6$; ****: $P < 0,0001$) der spannungsabhängigen Steigerung der Arrestin-Rekrutierung unter Applikation von $30 \mu\text{M}$ Morphin oder 50 nM DAMGO bei einem Depolarisationsschritt von -90 mV auf $+30 \text{ mV}$. Gestrichelte Linien zeigen spannungsinsensitives Verhalten an;

6.2.4 Die Spannungsinsensitivität des Met-Enkephalins bestätigt sich in der Arrestin-Rekrutierung

Der peptidische, natürliche Ligand an Opioid-Rezeptoren wurde bereits in Kapitel 6.1.4 hinsichtlich der Spannungssensitivität im G_o -Protein-Aktivierungsassay⁶³ untersucht. Dort konnten unter Applikation nicht-sättigender Met-Enkephalin-Konzentration keine spannungssensitiven Einflüsse nachgewiesen werden. Zur Verifizierung dieses Befundes wurde im Arrestin – Rekrutierungsassay mit sättigender Konzentration Met-Enkephalin stimuliert und eine mögliche auftretende Veränderung in der Rekrutierung, gemessen in der Interaktion des MOR mit Arrestin3 beobachtet. Im Gegensatz zu Morphin (siehe auch Kapitel 6.2.1 und 6.2.2) oder DAMGO (siehe auch Kapitel 6.2.3) konnte hier auch im statistischen Vergleich der FRET-Ratio bei -90 mV und $+30 \text{ mV}$ keine Veränderung in der Effektstärke des Met-Enkephalins detektiert werden (siehe **Abbildung 26 A, B**).

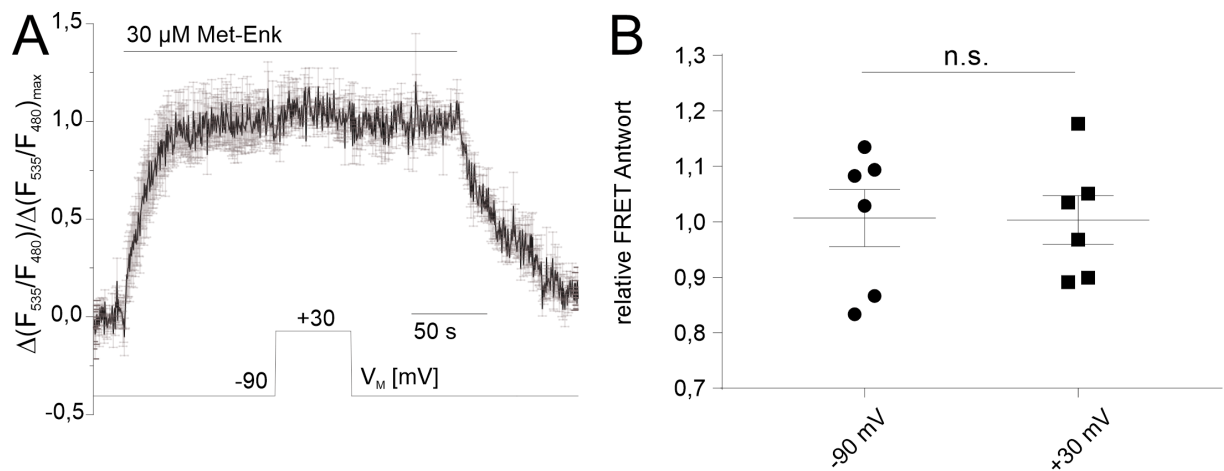


Abbildung 26: Die Spannungsinsensitivität des Met-Enkephalins bestätigt sich in der Arrestin-Rekrutierung.

A, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-sYFP2, Arrestin3-mTur2 und GRK2-wt transfiziert und mit sättigender Met-Enkephalin-Konzentration bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert auf die letzten 10 Sekunden der Met-Enkephalin-Antwort vor dem Auswaschen des Liganden und gemittelt ($\text{mean} \pm \text{S.E.M}$; $n = 5$); B, Analyse der Spannungsabhängigkeit des Met-Enkephalins; Daten aus A wurden mittels statistischem

Vergleich (gepaarter, zweiseitiger t-Test, $n = 5$; n.s.: $P > 0,05$) der spannungsabhängigen Veränderung der Arrestin-Rekrutierung unter Applikation bei einem Depolarisationsschritt von -90 mV auf +30 mV analysiert;

6.3 GRK2-Rekrutierung reflektiert die Spannungsabhängigkeit des MOR

6.3.1 Die Effektstärke der Morphin-vermittelten GRK2-Rekrutierung ist unter Depolarisation stark erhöht

Für Morphin ist in der Literatur eine verringerte Fähigkeit der Rekrutierung der GRK2/3 zum C-terminalen Teil des Rezeptors im Vergleich zu peptidischen Liganden wie DAMGO beschrieben^{48,84,124}. Einer der, in diesem Zusammenhang beobachteten Effekte ist die geringe Tendenz zur Internalisierung des MOR nach Stimulation mit Morphin⁴⁸. Um zu untersuchen, ob sich die Morphin-induzierte GRK2 – Rekrutierung unter Depolarisation ähnlich verändert, wie die Arrestin-Rekrutierung (siehe Kapitel 6.2.1, 6.2.2), wurde eine sättigende Konzentration Morphin (30 μ M) appliziert und eine Depolarisation auf +30 mV durchgeführt. Wie bereits in der Literatur beschrieben⁴⁸, führt Applikation von 30 μ M Morphin unter nicht-depolarisierten Bedingungen (-90 mV) lediglich zu einer 30,1 % (\pm 9,4 %) GRK2-Rekrutierung bezogen auf die DAMGO-induzierte Rekrutierung (hier definiert als Maximalantwort), die bei Depolarisation auf 72,9 % (\pm 13,4 %) anstieg (siehe **Abbildung 27 A, B**). Die dabei beobachtete Veränderung in der YFP/CFP Emission war auch in den CFP- und YFP- Einzelspuren detektierbar (**Abbildung 27 A**) und trat in Kontrollexperimenten, in denen ohne Agonistenapplikation umgeklemmt wurde (**Abbildung 27 C**), nicht auf. Vom Haltepotenzial (-90 mV) ausgehend wurden Depolarisationsschritte zu verschiedenen Potenzialen im Bereich von -120 mV bis +100 mV durchgeführt. Dabei wurde von den erhaltenen Werten der YFP/CFP Emission die Antwort bei -90 mV subtrahiert und die Antwort auf 0 mV, welche in allen ausgewerteten Zellen als Referenzantwort gemessen wurde, zur Normalisierung herangezogen. Die auf diese Weise erhaltenen relativen Änderungen in den Werten der YFP/CFP Emission wurden erneut an eine sigmoidale Boltzmann Funktion angepasst (**Abbildung 27 D**). Für die MOR – GRK2 – Interaktion ergab sich ein $V_{0.5} = -14$ mV sowie eine Elementarladungsverschiebung z von 0,44 e_0 ($n = 3 - 8$; $R^2 = 0,99$).

Da ein Einfluss des Membranpotenzials auf die Ligandenaffinität denkbar ist, der dazu führen könnte, dass die in der Literatur⁴⁹ als sättigende Konzentration (30 μ M) verwendete Morphin-Konzentration bei einem Haltepotenzial von -90 mV nicht-sättigend sein könnte, wurde dies in einem Kontrollexperiment überprüft: bei einem Haltepotenzial von -90 mV sind

die YFP/CFP Emissionswerte, erzeugt durch 30 μM und 100 μM Morphin im statistischen Vergleich nicht unterschiedlich (siehe **Abbildung 27 E**). Es lässt sich daraus schließen, dass auch bei -90 mV die verwendete Morphin-Konzentration (30 μM) sättigend war. Veränderungen in der GRK2-Rekrutierung nach Erreichen der Plateauphase bei Depolarisation zeigen daher lediglich eine Veränderung in der maximalen Morphin-induzierten Effektstärke an.

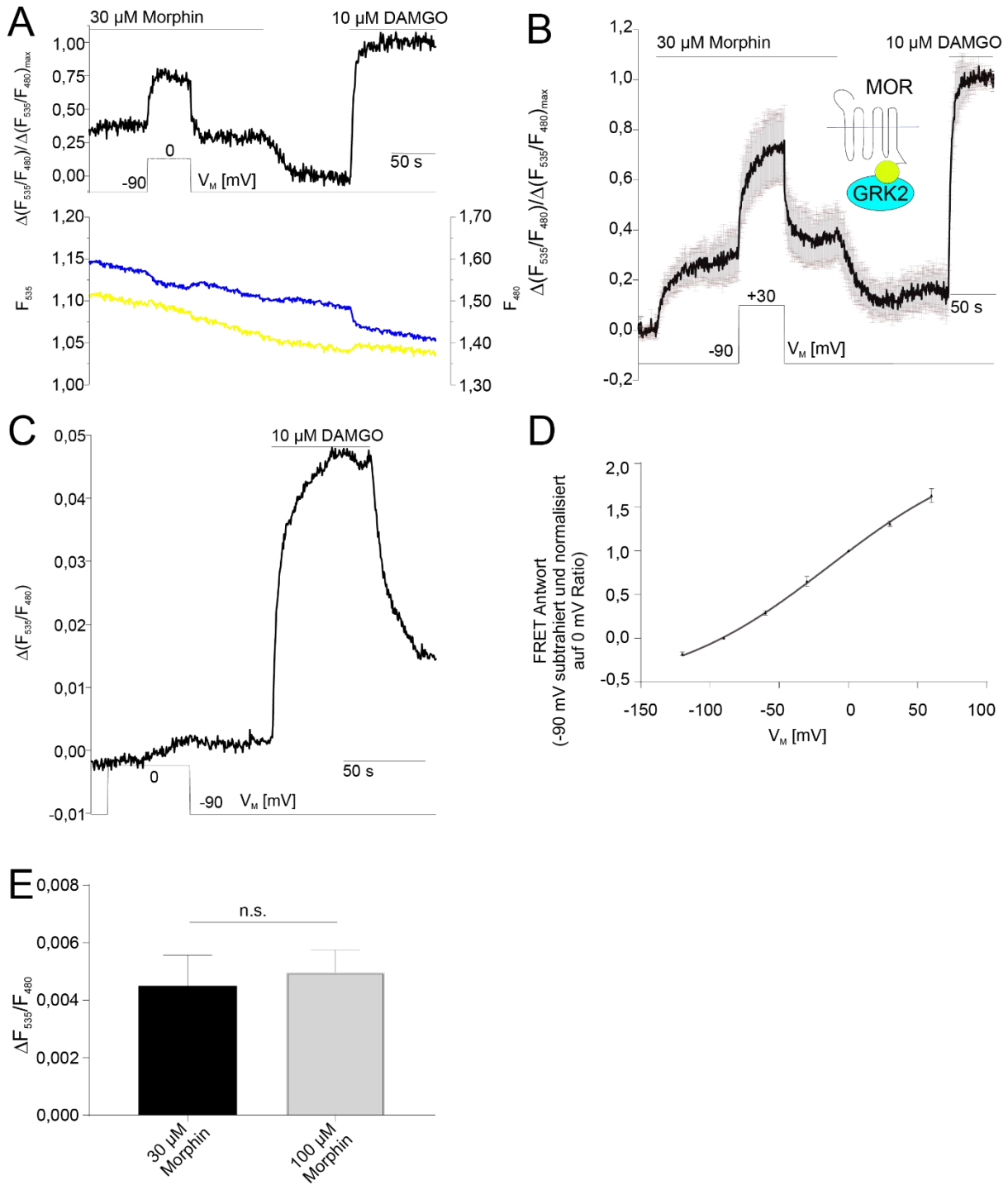


Abbildung 27: Die Effektstärke der Morphin-induzierten GRK2 – Rekrutierung ist unter Depolarisation stark erhöht.

A, Beispielhafte Darstellung einer Messung der YFP/CFP Emission (oben) und den zugehörigen Emissionen im CFP (blau) und YFP (gelb, unten) einer Zelle, die mit MOR-sYFP2, GRK2-mTur2 und heterotrimerem G_i -Protein transfiziert wurde; *B*, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-sYFP2, GRK2-mTur2 und heterotrimerem G_i -Protein transfiziert und mit sättigender ⁴⁹ Morphin- bzw. DAMGO-Konzentration bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert;

die Daten wurden normalisiert auf die DAMGO-Antwort bei -90 mV und gemittelt ($\text{mean} \pm \text{S.E.M}$; $n = 6$); C, Beispielhafte Darstellung der Depolarisation unter Pufferapplikation (repräsentative Zelle aus 6 Messungen), zur Kontrolle wurde nachfolgend eine sättigende Konzentration DAMGO ⁴⁹ appliziert; D, Zur Ermittlung des Zusammenhangs aus Depolarisation und Verstärkung der GRK2-Rekrutierung wurden die mit MOR-sYFP2, GRK2-mTur2 und heterotrimerem G_i -Protein transfizierten HEK 293T Zellen mit 30 μM Morphin stimuliert und zu verschiedenen Membranpotenzialen depolarisiert; die bei -90 mV erhaltene Antwort wurde als Nullwert definiert und die erhaltenen Veränderungen der YFP/CFP Emission auf die Antwort bei 0 mV normalisiert; die dabei erhaltenen Werte der relativen FRET Veränderung wurden mit einer sigmoidalen Boltzmann-Funktion gefittet ($n = 3 - 8$; $R^2 = 0,99$); E, Statistischer Vergleich der Morphin-induzierten absoluten Änderungen in der YFP/CFP Emission nach Applikation von 30 μM bzw. 100 μM Morphin (gepaarter, zweiseitiger t-Test, n.s.: $P > 0,05$; $n = 5$);

6.3.2 Effekte der Depolarisation auf Morphin- oder DAMGO-induzierte GRK2 – Rekrutierung verdeutlichen Liganden-spezifische Unterschiede

DAMGO wird in der Literatur bereits als Ligand beschrieben, der in nicht depolarisierten Zellen eine ausgeprägte GRK2-Rekrutierung bewirkt und daher dort auch als Referenzsubstanz verwendet wird ^{48,84,124}. Da unter Morphin-Applikation bei Depolarisation eine deutliche Steigerung der GRK2-Rekrutierung beobachtet wurde (siehe Kapitel 6.3.1), wurde das gleiche Depolarisationsprotokoll auch auf eine sättigende Konzentration (10 μM) DAMGO angewendet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der G-Protein-Aktivierung und der Arrestin-Rekrutierung wurde für DAMGO lediglich eine kleine Steigerung in der GRK2-Rekrutierung beobachtet (siehe **Abbildung 28 A**). Im statistischen Vergleich konnte gezeigt werden, dass sich das Ausmaß der spannungsabhängigen Veränderung der Liganden-induzierten GRK2-Rekrutierung zwischen Morphin und DAMGO deutlich unterscheidet: während das Morphin-induzierte Signal unter Depolarisation 3,2fach ($\pm 0,6$) ansteigt, wird das DAMGO-induzierte Signal lediglich um rund 10 % gesteigert, auf das 1,1 fache ($\pm 0,09$) (**Abbildung 28 B**).

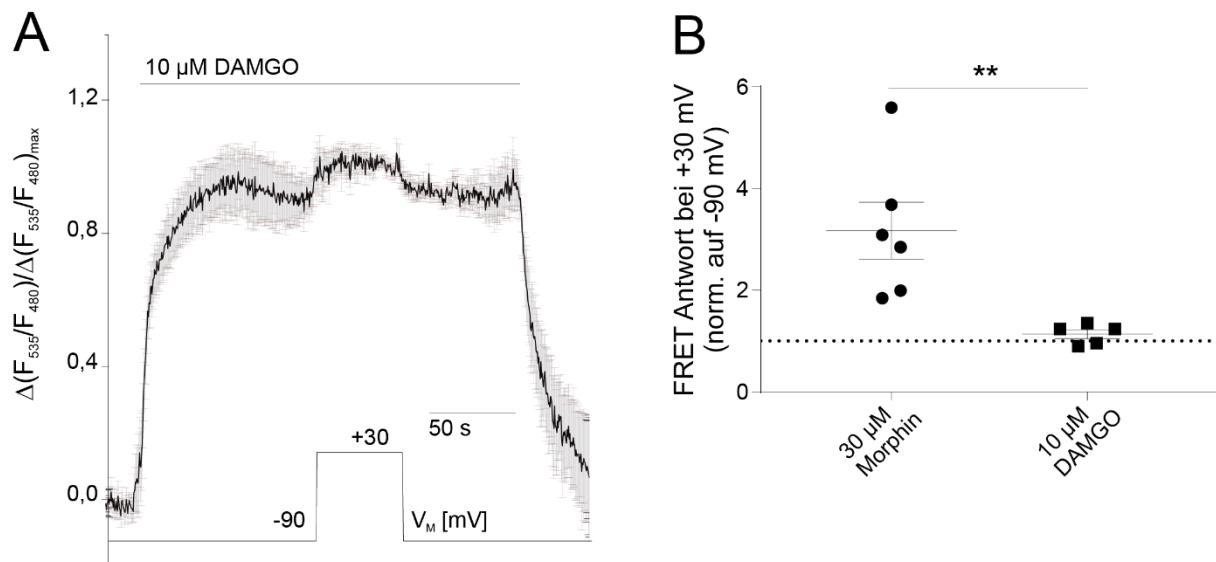


Abbildung 28: Effekte der Depolarisation auf Morphin- oder DAMGO-induzierte GRK2-Rekrutierung verdeutlichen Liganden-spezifische Unterschiede.

A, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-sYFP2, GRK2-mTur2 und heterotrimerem G_i -Protein transfiziert und mit sättigender DAMGO-Konzentration bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; die Daten wurden normalisiert auf die DAMGO-Antwort bei -90 mV und gemittelt (mean \pm S.E.M; $n = 5$); *B*, statistischer Vergleich (ungepaarter, zweiseitiger *t*-Test, $n = 5 - 6$; **: $P < 0,01$) der spannungsabhängigen Steigerung der GRK2-Rekrutierung unter Applikation von 30 µM Morphin oder 10 µM DAMGO bei einem Depolarisationsschritt von -90 mV auf +30 mV. Gestrichelte Linien zeigen spannungsinsensitives Verhalten an;

6.4 Die Spannungssensitivität des MOR lässt sich durch Veränderungen im GIRK-Strom zeigen

Die Aktivierung von G-Protein aktivierten einwärtsgerichteten K^+ (GIRK) -Kanälen stellt einen physiologischen Effekt der MOR-vermittelten G-Protein-Aktivierung dar (siehe Kapitel 3.4.2), da hierbei $G\beta\gamma$ -Untereinheiten in regulatorischer Weise an den GIRK Kanal binden^{69,186} und dort eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals bewirken. Somit kann durch Messung von Veränderungen in den GIRK-Strömen direkt ein Hinweis auf die pharmakologische Relevanz der beobachteten Spannungssensitivität des MOR auf molekularer Ebene gewonnen werden. In den nachfolgenden Abschnitten wurden daher sowohl im Überexpressionssystem in HEK 293T Zellen, als auch in Hirnschnitten, welche intakte Locus Coeruleus (LC) Neurone enthielten⁴, die Auswirkungen von Depolarisation auf K^+ -Ströme

⁴ Daten im LC generiert von S. Klindert und C. P. Bailey an der University of Bath (Großbritannien)

untersucht. Da GIRK-Ströme selbst einer Abhängigkeit vom Membranpotenzial unterliegen¹⁸⁷, wurde in den nachfolgenden Abschnitten zur Charakterisierung der Spannungsabhängigkeit stets der relative Vergleich der Membranpotenzialeffekte von Morphin und DAMGO bzw. Met-Enkephalin auf die Ströme gezogen.

6.4.1 Ströme in Einwärtsrichtung zeigen stärkere Spannungssensitivität des Morphins

Der Vorteil der Messung von GIRK-Strömen in Einwärtsrichtung liegt in dem linearen Zusammenhang von Strom und Membranpotenzial. Unter Einsatz hoher extrazellulärer K^+ -Konzentrationen (140 mM, Protokoll siehe Kapitel 4.4.3) lassen sich daher Ströme in der Größenordnung mehrerer nA mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzeugen. Bei Messung in Einwärtsrichtung lassen sich die Ströme durch extrazelluläre Applikation von Ba^{2+} rasch und reversibel blockieren¹⁸⁸, was als zusätzliches Identifikationsmerkmal von GIRK-Strömen herangezogen werden kann. Wie bereits in der Literatur gezeigt wurde, ist das Verhältnis von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zu GIRK-Kanal für die Einwärtsgleichrichtung von großer Bedeutung. Da in¹⁸⁸ eine Verringerung der Einwärtsgleichrichtung unter Co-Expression großer Mengen $G\beta\gamma$ beobachtet wurde, wurden in der vorliegenden Studie, ebenso wie in⁴⁵ lediglich die in HEK 293T Zellen endogen exprimierten G-Proteine verwendet.

Für die Messungen wurden nicht-sättigende Konzentrationen von Morphin (Mor) gewählt, die in nicht-depolarisierten Zellen (-90 mV) eine maximal 30 % Antwort – bezogen auf die DAMGO-induzierte Maximalantwort hervorrufen (**Abbildung 29 A, B**). Wie man aus der Strom-Spannungs-Kennlinie (siehe **Abbildung 29 C**) erkennen kann, nehmen die gemessenen Ströme generell in einem linearen Zusammenhang von -90 mV zu -20 mV ab, weshalb die nominelle Amplitude, die Morphin bei -20 mV erzeugt auch deutlich kleiner ausfällt, als bei -90 mV (siehe **Abbildung 29 A**). Vergleicht man die relativen Morphin-induzierten Ströme zwischen -90 mV und -20 mV, so ist eine signifikante Erhöhung der proportionalen Morphin-induzierten Antwort von 18 % ($\pm 1,7$ %) bei -90 mV auf 51,5 % ($\pm 2,6$ %) bei -20 mV erkennbar (siehe **Abbildung 29 B**). Für die statistische Auswertung wurden jeweils die 2 s vor dem Auswaschen (Morphin bzw. DAMGO bei -90 mV) bzw. Umklemmen (DAMGO bei -20 mV) als Referenzzeitraum verwendet. Durch Ba^{2+} -Applikationen (rote Linien in **Abbildung 29 A, D**) wurden zu mehreren Zeitpunkten während der Messung die gemessenen Ströme schnell und reversibel blockiert und damit die Beteiligung von GIRK-Kanälen am gemessenen Signal belegt¹⁸⁸.

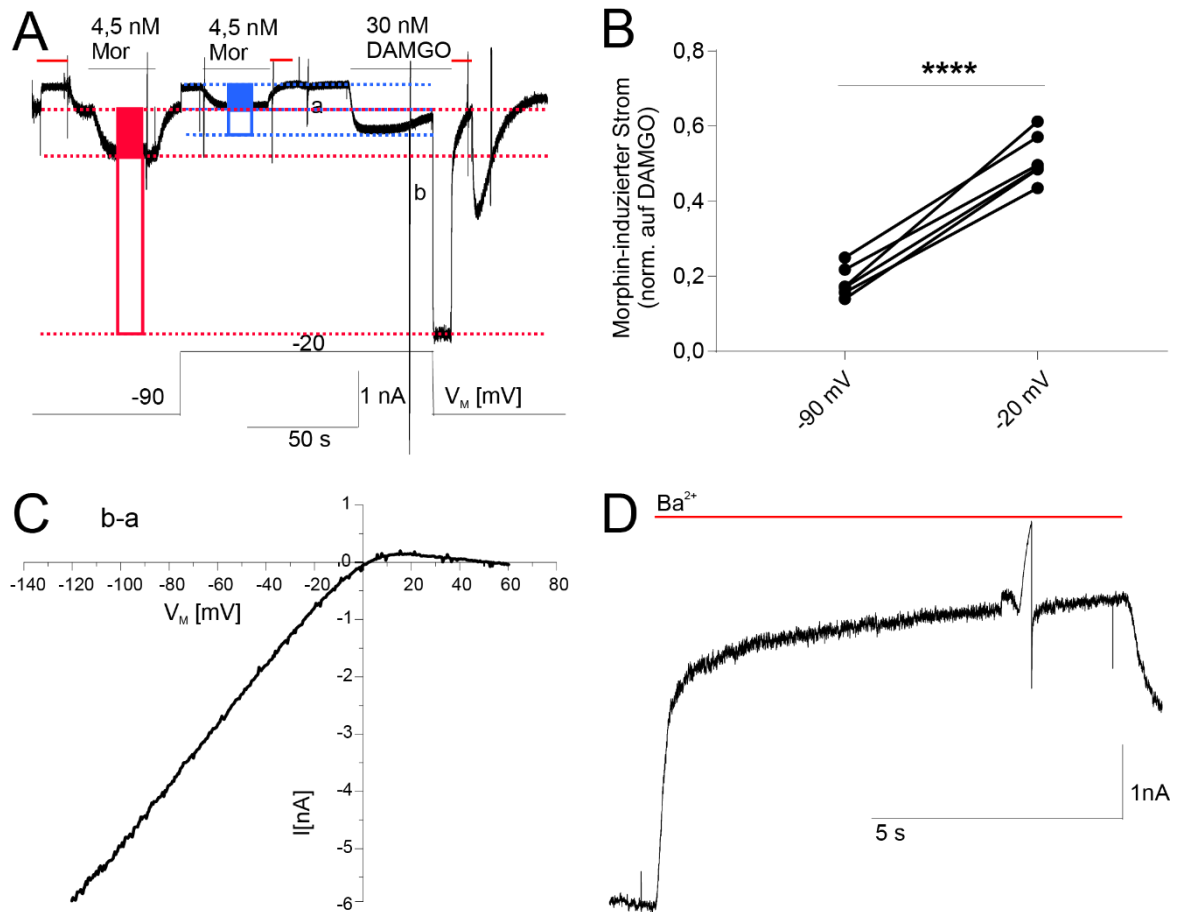


Abbildung 29: Ströme in Einwärtsrichtung zeigen Spannungssensitivität des MOR.

A, Beispielhafte Messung (aus 6 Zellen) von Einwärtsströmen in HEK 293T Zellen, die mit MOR-wt, GIRK 1/4 und pcDNA3-eCFP transfiziert wurden; GIRK-Ströme wurden mit 4,5 nM Morphin (Mor) oder 30 nM DAMGO erzeugt und zwischen -90 mV (rot) und -20 mV (blau) verglichen. Zur Verdeutlichung der Amplitudenhöhen wurden Balken eingefügt. Ausgefüllte Balken zeigen relative Morphin-Responsivität, leere Balken zeigen (maximale) DAMGO-Reaktion. Schwarze Linien zeigen Ligandenapplikation an, rote Linien markieren GIRK-Blockade mit Ba^{2+} . Während der Messungen wurden mehrere Rampentests für die Strom-Spannungskennlinie durchgeführt. Dafür verwendete Rampen sind mit a (Hintergrundmessung) und b gekennzeichnet. B, Bei Applikation nicht-sättigender Morphin-Konzentration gemessene GIRK-Ströme ($n = 6$) wurden auf die DAMGO-vermittelte Maximalamplitude normalisiert und mit einem zweiseitigen, gepaarten t-Test (****: $P < 0,0001$) statistisch verglichen. C, Strom-Spannung-Kennlinie die von Hintergrundrauschen (a, Daten aus A) bereinigt wurde zeigt starke Einwärtsgleichrichtung. D, Ba^{2+} -Blockade der in Einwärtsrichtung gemessenen Ströme induziert starke GIRK-Kanal-Beteiligung am gemessenen Signal;

6.4.2 Ströme in Auswärtsrichtung zeigen stärkere Spannungssensitivität des Morphins

Während die Messungen in Einwärtsrichtung die Applikation von Puffern mit unphysiologisch hohen K^+ -Konzentrationen erforderten, wurden in der Auswärtsrichtung Puffer in physiologischerer Zusammensetzung verwendet (Protokoll siehe Kapitel 4.4.3). In einer Publikation zum $P2Y_1R$ wurde festgestellt, dass schon kleine Erhöhungen der extrazellulären K^+ -Konzentration einen Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion haben können¹⁸⁹ (gemessen hier am Ca^{2+} -Efflux), die nicht alleine auf depolarisationsinduzierte, spannungsabhängige Effekte am Rezeptor zurückzuführen sind. Daher war es wünschenswert, die Messungen auch unter Verwendung physiologischer K^+ -Konzentration reproduzieren zu können. In der Strom-Spannungs-Kennlinie (siehe **Abbildung 30 A**) lässt sich erkennen, dass die Ströme in Auswärtsrichtung deutlich kleiner sind und im physiologischen Membranpotenzial-Bereich keinem linearen Zusammenhang zwischen Strom und Spannung unterliegen. Da die Ströme in Auswärtsrichtung zwischen -90 mV und -60 mV klein sind, wurde ein Protokoll gewählt, in dem -50 mV als nicht-depolarisiertes Haltepotenzial mit 0 mV verglichen wurde (siehe **Abbildung 30 B**). An der verschobenen Basalamplitude unter Pufferapplikation ist bereits erkennbar, dass die bei 0 mV gemessenen Ströme durch den GIRK-Kanal generell größer sind, als bei -50 mV. Von Interesse sind an dieser Stelle allerdings wie in Kapitel 6.4.1 die Verhältnisse der, durch nicht-sättigende Konzentration Morphin (Mor) hervorgerufenen Ströme im Vergleich zu maximalen Amplituden, hervorgerufen durch sättigende Konzentration DAMGO. Dies wird in **Abbildung 30 B** durch ausgefüllte Balken (für Morphin) bzw. nicht-ausgefüllte Balken (DAMGO) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurden als Referenzzeitpunkte an dieser Stelle jeweils 2 s vor Auswaschen (Morphin bei -50 mV / 0 mV, DAMGO bei -50 mV) bzw. 2 s vor Zurückklemmen (DAMGO bei 0 mV) verwendet. Statistische Analyse der auf diese Art erhaltenen Amplituden für Morphin und DAMGO zeigen, dass die proportionale Morphin-Antwort bei Depolarisation auf 0 mV signifikant größer wird (siehe **Abbildung 30 C**). Da DAMGO bei 0 mV eine deutliche Tendenz zur Desensitivierung zeigt, wurde zudem eine alternative Evaluation der Ströme durchgeführt, bei der der Maximalwert für die DAMGO-Antwort bei 0 mV als Referenz genommen wurde (siehe **Abbildung 30 D**). Da die Messungen der DAMGO-induzierten Ströme bei -50 mV nur nach bereits erfolgter Desensitivierung durchgeführt wurden, stellt dies eine besonders kritische Evaluation dar, bei der Morphin bei -50 mV mit kleineren, desensitvierten DAMGO-Amplituden verglichen wird während Morphin bei 0 mV mit größeren, nicht-desensitvierten

DAMGO-Amplituden verglichen wird. Dennoch ist die spannungsabhängige Steigerung der proportionalen Morphin-Antwort auch bei dieser Auswertung noch statistisch signifikant (siehe **Abbildung 30 E**).

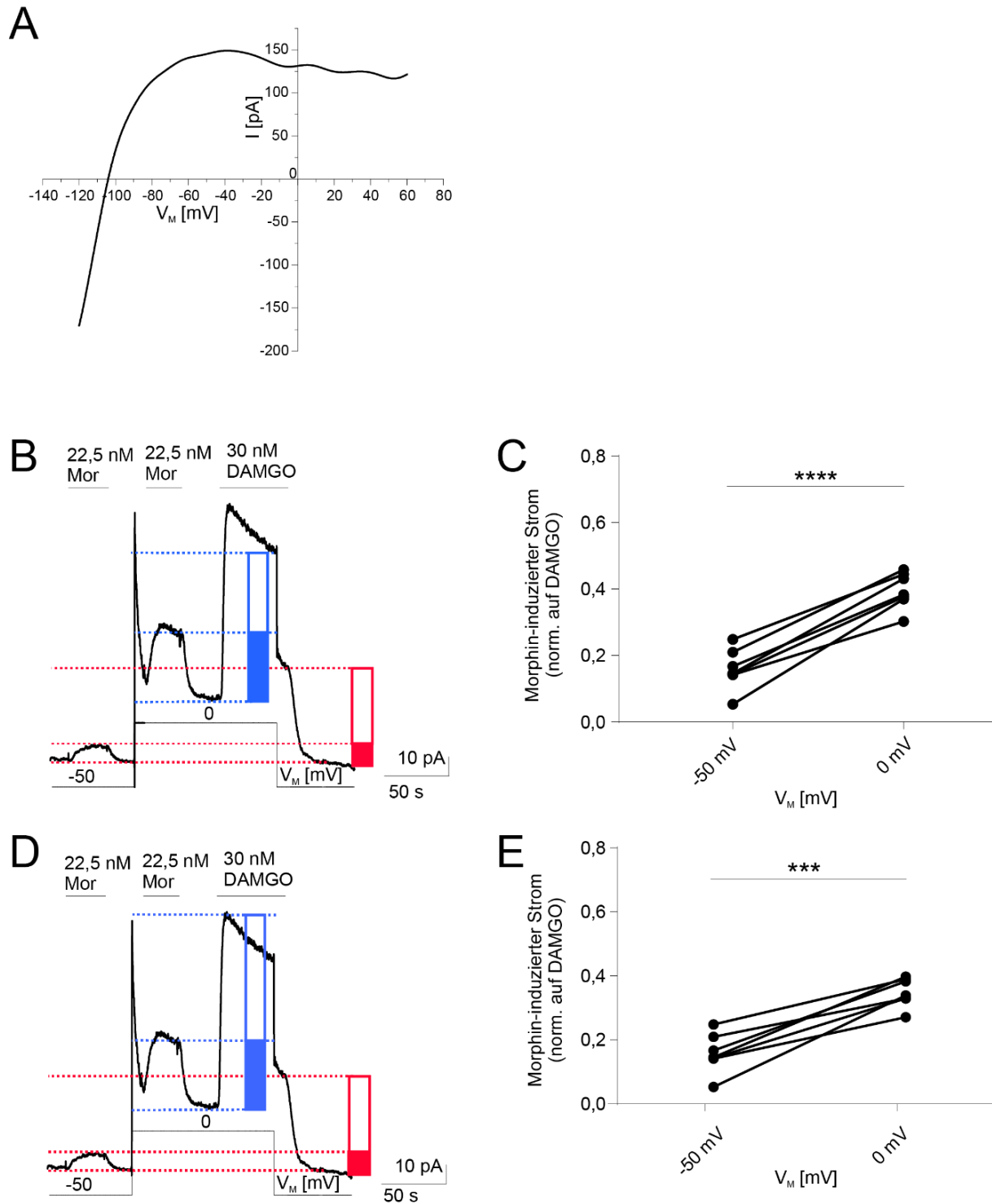


Abbildung 30: Ströme in Auswärtsrichtung zeigen stärkere Spannungssensitivität des Morphins.

*A, Beispielhafte Darstellung einer Strom – Spannungskennlinie bei Messung der Auswärtsströme; B, Beispielhafte Messung (aus 7 Zellen) von Auswärtsströmen in HEK 293T Zellen, die mit MOR-wt, GIRK 1/4 und pcDNA3-eCFP transfiziert wurden; GIRK-Ströme wurden mit 22,5 nM Morphin (Mor) oder 30 nM DAMGO erzeugt und zwischen -50 mV und 0 mV verglichen. Schwarze Linien zeigen Ligandenapplikation an, zur Verdeutlichung der Amplitudenhöhen wurden Balken eingefügt: blau: 0 mV, rot: -50 mV; ausgefüllte Balken: Morphin, leere Balken: DAMGO-induzierte Maximalantwort. Referenzzeiträume für die Evaluation lagen unmittelbar vor dem Auswaschen bzw. Umklemmen. C, Bei Applikation nicht-sättigender Morphin-Konzentration gemessene GIRK-Ströme ($n = 7$) wurden auf die DAMGO-vermittelte Maximalamplitude normalisiert und mit einem zweiseitigen, gepaarten t-Test (****: $P < 0,0001$) statistisch verglichen. D, Daten aus B mit alternativer Auswertung: für DAMGO wurde der Maximalwert vor Desensitivierung als Referenz verwendet, während Morphin wie in B ausgewertet wurde; E, statistische Auswertung der Daten aus D ($n = 7$) mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test (***: $P < 0,001$);*

6.4.3 Daten aus GIRK-Strömen in HEK 293T Zellen lassen sich mit Gi-Protein-Aktivierungsassay reproduzieren

Die spannungsabhängige Steigerung der Morphin-induzierten Signaltransduktion wurde im G-Protein-Aktivierungsassay (siehe Kapitel 6.1.1) und in GIRK-Strömen (siehe Kapitel 6.4.1, 6.4.2) nachgewiesen. Nun sollte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den beiden Assays analysiert werden, indem das Protokoll aus Kapitel 6.4.2 auch auf HEK 293T Zellen, die mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$, $G\gamma_2$ -wt transfiziert und mit Morphin in nicht-sättigender Konzentration und DAMGO in sättigender Konzentration stimuliert wurden. Die dabei erhaltenen FRET-Änderungen wurden analog zu Kapitel 6.4.1 und 6.4.2 verglichen. Vorteil dieser Messmethode ist, dass bei Depolarisation keine Veränderung in der basalen Antwort stattfindet (siehe **Abbildung 16 B**). Schon in der Darstellung der YFP/CFP Emission wird sichtbar, dass die Applikation von 22,5 nM Morphin (Mor) unter 0 mV eine deutlich stärkere G-Protein-Aktivierung bewirkt, als bei -50 mV (siehe **Abbildung 31 A**). Der statistische Vergleich zeigt ebenfalls eine signifikante Steigerung in der Morphin-induzierten G-Protein-Aktivierung (**Abbildung 31 B**). Mit der GIRK-Strom-Messung in Auswärtsrichtung bestimmte Ergebnisse zur Spannungssensitivität können folglich in ähnlichem Ausmaß auch in der G-Protein-Aktivierung dargestellt werden.

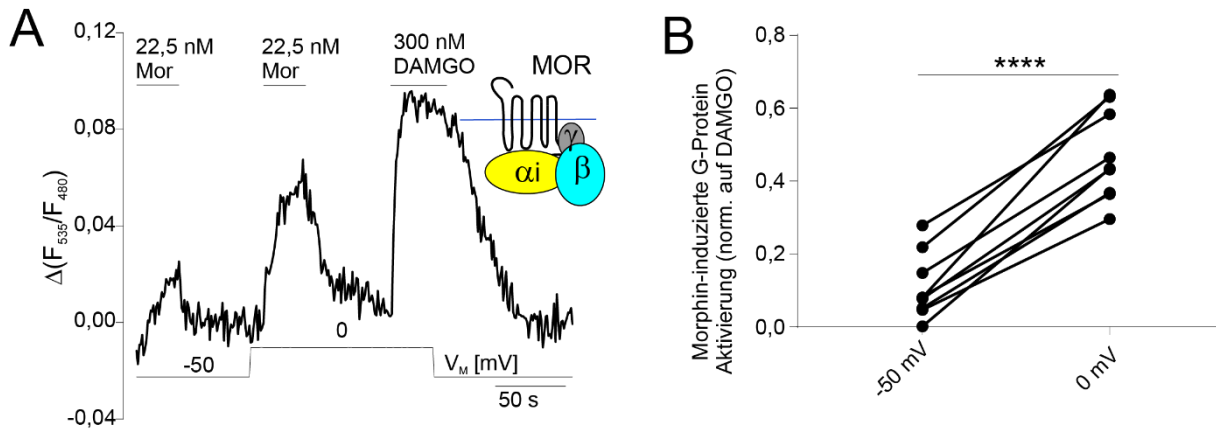


Abbildung 31: Daten aus GIRK-Strömen lassen sich mit einem Gi-Protein-Aktivierungsassay reproduzieren.

A, HEK 293T Zellen wurden mit MOR-wt, $G\alpha_i$ -YFP, mTur2- $G\beta_1$, $G\gamma_2$ -wt transfiziert und mit Morphin (Mor) bzw. DAMGO bei angegebenen Membranpotenzialen stimuliert; beispielhafte Darstellung (aus 9 Zellen); B, Bei Applikation von Morphin erhaltene Amplituden wurden auf die DAMGO-vermittelten Maximalantworten normalisiert und die proportionale Morphin-Antwort zwischen -50 mV und 0 mV mit einem zweiseitigen, gepaarten t-Test verglichen (****: $P < 0,0001$; $n = 9$);

6.4.4 Morphin- induzierte GIRK-Ströme in LC Neuronen werden stärker potenziert als DAMGO- oder Met-Enkephalin-induzierte Ströme⁵

Die bisherigen Daten zur Spannungssensitivität wurden alle in einzelnen, lebenden transfizierten HEK 293T Zellen gewonnen. Die dabei beobachteten spannungssensitiven Effekte sind groß, stellen jedoch Messungen in artifiziellen biologischen Systemen mit überexprimierten Interaktionspartnern dar. Aus diesem Grund sollten zudem Messungen in natürlichem Zellsystem durchgeführt werden. Ein etabliertes Zellsystem^{187,190–192} zur Messung MOR-indizierter GIRK-Ströme in nativem Gewebe sind Locus Coeruleus (LC) Neurone. Diese Neurone bieten den Vorteil, dass dort neben dem MOR keine weiteren Opioid-Rezeptoren exprimiert werden¹⁸⁷ und bei Applikation von Opioiden die gemessenen Ströme spezifisch auf den MOR zurückzuführen sind. Die Messungen wurden ebenfalls unter Verwendung physiologischer K^+ -Konzentrationen durchgeführt und erfolgten daher in Auswärtsrichtung. Aufgrund der Beobachtung, dass bei Membranpotenzialen oberhalb von -40 mV die Messungen durch spontanes Feuern durch Tetrodotoxin (TTX)-insensitive Ionenkanäle gestört

⁵ Daten im LC generiert von S. Klindert und C. P. Bailey an der University of Bath (Großbritannien); statistische Auswertung durch J.G. Ruland

wurden und unterhalb von -80 mV die gemessenen Ströme sehr klein waren, blieb für die LC Messungen der Messkorridor von -80 mV bis -40 mV.

Aufgrund der schlechten Auswaschbarkeit des Morphins aus den verwendeten LC-Schnitten musste zudem das Messprotokoll im Vergleich zu dem Zeitverlauf der Messungen in HEK 293T Zellen abgeändert werden: zunächst wurde Met-Enkephalin appliziert, das sich deutlich besser auswaschen ließ und im Anschluss Morphin, welches mit Naloxon, einem Antagonisten am MOR ausgewaschen wurde. Da Met-Enkephalin (und auch DAMGO) in sättigender Konzentration eine ausgeprägte Desensitivierung induzieren ¹⁹², wurde Met-Enkephalin als Referenzsubstanz nur in Konzentrationen appliziert, die eine etwa halbmaximale Antwort hervorriefen. Alle Messungen erfolgten in Anwesenheit von TTX, da sonst bei Depolarisation die Öffnung spannungsaktivierter Natriumkanäle ¹⁹³ die Messungen gestört hätten. Um eine Sättigung in der Morphin-induzierten Antwort zu vermeiden, wurde Morphin ebenfalls in etwa halbmaximaler Konzentration verabreicht (so wie auch in Messungen zur G-Protein-Aktivierung oder den GIRK Messungen in HEK 293T Zellen, siehe auch Kapitel 6.1, 6.4.1, 6.4.2 bzw. 6.4.3). Da sich der basale Strom durch den GIRK-Kanal in Abhängigkeit des Membranpotenzials ebenfalls ändert, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Messung unter Pufferapplikation (aCSF) ebenfalls die gleiche Depolarisation durchgeführt. Die Antworten unter aCSF-Applikation wurden herangezogen um über eine Drei-Punkt-Gerade das basale GIRK-Strom-Niveau anzuzeigen (siehe **Abbildung 32 A**). Die von dieser Basallinie ausgehenden Differenzen zu den unter Agonist-Applikation und entsprechender Depolarisation gemessenen Antworten wurden aus Kontrollgründen auf zwei verschiedene Arten statistisch ausgewertet: zunächst wurde die Liganden-spezifische Veränderung betrachtet (siehe **Abbildung 32 B**). Dabei wurden die absoluten GIRK-Ströme bei -80 mV und -40 mV auf die entsprechende Liganden-induzierte Antwort bei -60 mV normalisiert und gemittelt (mean \pm S.E.M.); der statistische Vergleich der gemittelten Werte wurde mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test durchgeführt und für signifikant befunden; die zweite Methode der Evaluation wurde in Analogie zu den Messungen der GIRK-Ströme in HEK 293T Zellen (siehe Kapitel 6.4.1 und 6.4.2) durchgeführt. Während in HEK 293T Zellen die nicht-sättigenden Morphin-induzierten Antworten stets gegen sättigende DAMGO-Antworten verglichen werden konnten, erfolgte der Vergleich in den LC-Schnitten stets gegen nicht-sättigende Met-Enkephalin-Antworten, woraus sich eine größere Streuung in den relativen Morphin-induzierten Antworten als in HEK 293T Zellen ergaben. Die, bei höheren Membranpotenzialen beobachtete verstärkte relative Morphin-Responsivität wurde dennoch auch in diesem Experiment als statistisch signifikant geprüft (siehe **Abbildung 32 C**). Um die Möglichkeit

auszuschließen, dass während des Messprotokolls eine zeitabhängige Veränderung der GIRK-Ströme bei Depolarisation auftritt, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, in dem zwei aufeinanderfolgende Met-Enkephalin-Applikationen stattfanden (siehe **Abbildung 32 D**) und die dabei gemessenen Veränderungen im Strom bei Depolarisation statistisch verglichen wurden. Es zeigte sich hierbei, im Gegensatz zur Beobachtung, dass die relativen Morphin-Antworten bei Depolarisation größer werden, dass bei zweimaliger Met-Enkephalin-Applikation die zweiten Depolarisationen von -60 mV auf -40 mV statistisch signifikant kleiner ausfielen und der Depolarisationseffekt auf Morphin somit aufgrund der zeitabhängigen Effekte tendenziell eher unter- statt überschätzt wird. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde untersucht, ob Spannungsabhängigkeit in ähnlichem Maße gemessen werden kann, wenn nur der einzelne Ligand appliziert wird (d.h. Met-Enkephalin, DAMGO oder Morphin, siehe **Abbildung 32 E**). Dabei wurde beobachtet, dass die Morphin-vermittelte Antwort bei Depolarisation von -60 mV auf -40 mV ebenfalls statistisch signifikant stärker steigt, als dies unter Applikation von Met-Enkephalin oder DAMGO der Fall ist. Somit können Protokoll-abhängige Effekte als Erzeuger einer vermeintlichen Spannungsabhängigkeit ausgeschlossen werden und das spannungssensitive Verhalten des Morphins kann auch in LC-Messungen als gesichert angenommen werden.

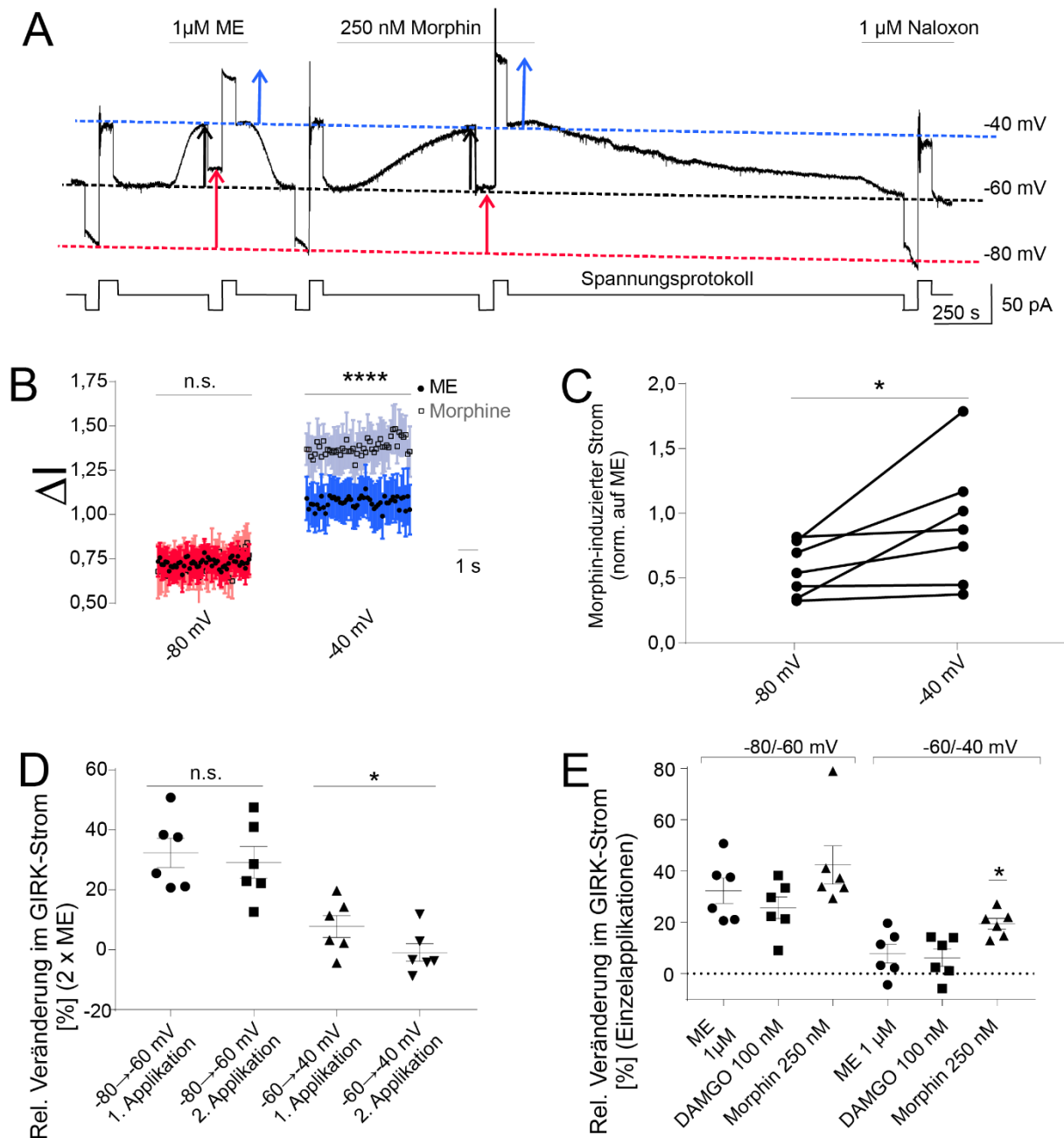


Abbildung 32: Morphine- induzierte GIRK-Ströme in LC Neuronen werden stärker potenziert als DAMGO- oder Met-Enkephalin-induzierte Ströme.

A, Beispielhafte Messung (aus 7 Zellen) von K^+ -Strömen in Auswärtsrichtung. GIRK-Ströme wurden durch Morphin oder Met-Enkephalin induziert. Während der Messungen wurde das Membranpotenzial auf -60 mV gehalten und von dort ausgehend sowohl unter Applikation von aCSF, als auch unter Liganden-Applikation kurz auf -80 mV (rot) und auf -40 mV (blau) depolarisiert. Die unter aCSF-Applikation erhaltenen basalen Ströme dienten zur Bestimmung der Nullniveaus (gestrichelte Linien, in jeweiliger Farbe), Agonisten-induzierte Änderungen im Strom sind mit Pfeilen (in der Farbe des entsprechenden Membranpotenzials) gekennzeichnet. Die schwarze Linie (unten) zeigt das Spannungsprotokoll schematisch an. B, statistischer

Vergleich der Daten aus A (zweiseitiger, ungepaarter t-Test, ****: $P < 0,0001$, $n = 7$) der spannungsabhängigen Veränderungen im GIRK-Strom; absolute GIRK-Antworten bei -80 mV bzw. -40 mV wurden auf die Antwort des jeweiligen Liganden (Morphin oder ME) bei -60 mV normalisiert (ΔI) und gemittelt ($\text{mean} \pm \text{S.E.M}$); C, alternative Auswertung der Daten aus B, bei der die Morphin-induzierten Antworten stets auf die ME-induzierten (nicht-sättigenden) Antworten normalisiert wurden und die dabei analysierten GIRK-Ströme zwischen den angegebenen Membranpotenzialen verglichen wurden (zweiseitiger, gepaarter t-Test, *: $P < 0,05$, $n = 7$); D, Analyse der Veränderungen im GIRK-Strom bei Protokollen mit zweimaliger Applikation eines Liganden (ME); die GIRK-Ströme die bei erster bzw. zweiter Applikation bei den jeweils angegebenen Depolarisationsschritten entstanden, wurden mit einem zweiseitigen, gepaarten t-Test verglichen (*: $P < 0,05$); E, Analyse der relativen Änderung (im Vergleich zum jeweils niedrigeren Membranpotenzial) im gemessenen GIRK-Strom unter Einzelapplikation von DAMGO, Morphin oder ME bei Depolarisation zu den angegebenen Membranpotenzialen (*: $P < 0,05$, gewöhnliche, einseitige ANOVA mit nachfolgendem Tukey's multiplem Vergleichstest, $n = 6$);

7. Diskussion

G-Protein gekoppelte Rezeptoren stellen einen der wichtigsten Angriffspunkte in der Pharmakotherapie einer Vielzahl von Erkrankungen dar ²⁰. Seit der ersten Beschreibung der Spannungsabhängigkeit eines G-Protein gekoppelten Rezeptors ³⁵ wurden zahlreiche Studien unternommen um Spannungsabhängigkeit an weiteren GPCRs sowie in detaillierter mechanistischer Form ^{36,44,45,134} beschreiben zu können. Es zeigte sich dabei in mehreren Studien, dass die Spannungsabhängigkeit intrinsische Eigenschaft der untersuchten GPCRs ist ^{36,45,46,134} und die depolarisationsbedingten Änderungen am GPCR sowohl Einfluss auf die Ligandenbindungsaffinität ^{44,45,129,132,141}, als auch auf die maximale Effektstärke von Liganden am Rezeptor ^{45,129} haben kann. Die dabei verwendeten Methoden umfassten unter anderem die Messung depolarisationsinduzierter Veränderungen unter direkter Kontrolle des Membranpotenzials in K^+ - ^{130,135,194} oder Ca^{2+} -Strömen ^{40,140} an G_i - bzw. G_q -gekoppelten Rezeptoren sowie die Beobachtung konformationeller Veränderungen am Rezeptor mittels fluoreszenzbasierter Assays ^{37,38,44–46,134}. Die depolarisationsbedingten Modulationen am Rezeptor sind aus physiologischer Sicht dabei für jene GPCRs von besonderem Interesse, die in leicht erregbarem Gewebe exprimiert werden. Ein GPCR mit Expression in neuronalem Gewebe und hoher therapeutischer Relevanz ¹¹⁵ ist der μ -Opioid-Rezeptor, dessen Aktivierung nicht nur mit einer ausgeprägten Analgesie und Euphorisierung in Verbindung steht, sondern auch mit unangenehmen Effekten wie der Atemdepression oder Obstipation ¹¹⁰. Zudem stellt der MOR einen extensiv untersuchten ¹¹⁰ Vertreter der GPCRs der Klasse A dar, welcher durch peptidische natürliche Liganden aktiviert wird. GPCRs, die durch peptidische Liganden aktiviert werden stellen eine riesige Gruppe von über 100 Rezeptoren dar ¹⁹⁵, wobei peptidische Neurotransmitter nicht nur eine entscheidende Rolle für die Funktion im Gastrointestinaltrakt spielen, ¹⁹⁶ sondern im gesamten Nervensystem ¹⁹⁷. Dies war ebenfalls eine Motivation zur Durchführung der vorliegenden Studie, da meines Wissens nach bisher kein durch peptidische Liganden aktivierter GPCR im Hinblick auf Spannungsabhängigkeit charakterisiert worden war.

Die verschiedenen durchgeführten Untersuchungen am MOR, die *whole-cell* Spannungs-klemme mit verschiedenen FRET-basierten Assays kombinierten und auch die Messung Rezeptor-induzierter Ionenkanalaktivierung beinhalteten, konnten im Zellsystem an HEK 293T Zellen und in nativen LC-Schnitten folgende Erkenntnisse erbringen: 1.) Die Aktivität des MOR wird spannungsabhängig sehr stark moduliert. 2.) Diese spannungsabhängigen Veränderungen am MOR treten im Bereich der physiologischen

Membranpotenziale auf. 3.) Die Spannungsabhängigkeit verändert die maximale Effektstärke des Morphins in besonders großem Umfang. 4.) Die starke spannungsabhängige Modulation des MOR wird sowohl in der G-Protein-Signaltransduktion, als auch in der GRK2- und Arrestin-Interaktion sichtbar. 5.) Auch in physiologischem Gewebe kann die Spannungsabhängigkeit des MOR beobachtet und gemessen werden. 6.) Zudem wird aus den Vergleichen der Spannungsabhängigkeit zwischen dem alkaloidischen Liganden Morphin und den peptidischen Liganden DAMGO und Met-Enkephalin ersichtlich, dass sehr starke ligandenspezifische Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit bestehen.

7.1 Aktivität des MOR wird spannungsabhängig sehr stark moduliert.

In FRET-basierten Assays, die es erlaubten die MOR-vermittelte $G_{i/o}$ -Aktivierung, die GRK2-Rekrutierung zum Rezeptor oder die Arrestin-Interaktion mit dem MOR zu untersuchen, konnte eine spannungsabhängige Steigerung beobachtet werden. Sämtliche hierbei beobachteten Membranpotenzial-vermittelten Effekte waren deutlich ausgeprägt, traten nur in Anwesenheit des Liganden auf und waren unter Zurückklemmen reversibel. Auch in transfizierten HEK 293T Zellen konnte sowohl in Einwärts- als auch Auswärtsrichtung beobachtet werden, dass die Morphin-induzierten GIRK-Ströme spannungsabhängig moduliert werden. Zudem konnten diese Effekte in LC-Schnitten, einem natürlichem Zellsystem, das keinerlei Überexpression bestimmter Proteine zeigt, und daher die natürliche Zellphysiologie abbildet, beobachtet werden. Die Depolarisations-induzierten Effekte müssen daher an Veränderungen im MOR selbst liegen. Ein ideales Mittel zur Demonstration der intrinsischen Spannungsabhängigkeit des Rezeptors ¹⁹⁸, das auch in mehreren Studien zur Spannungsabhängigkeit bereits angewendet werden konnte ⁴⁴⁻⁴⁶, wäre der Nachweis veränderter Rezeptoraktivierung mittels intramolekularem FRET-basierten Rezeptor-Sensor, da er die bei Rezeptor-Aktivierung auftretenden Veränderungen im Rezeptormolekül selbst darstellen kann. Im Detail wurden die Bemühungen zur Generierung eines funktionalen Rezeptor-Sensors in Kapitel 5 erörtert. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass ein Konstrukt kloniert wurde, das bei maximaler Rezeptoraktivierung eine 1 – 2 %-Änderung in der YFP/CFP Emission zeigte (siehe Kapitel 5.1.3). Diese Signalgröße war nicht ausreichend, um eine zuverlässige Quantifizierung spannungsinduzierter Effekte zuverlässig durchzuführen. Auch verschiedene Optimierungsversuche am Konstrukt zeigten keine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Bisher findet sich in der Literatur ein publizierter, in der dritten Intrazellulärschleife fluoreszenzmarkierter Sensor für den MOR ¹⁹⁹. Hier wurde das GFP an einer anderen Stelle, als den von mir versuchten, an R263 eingefügt. Auch dieser zeigte, wie

das S266-Konstrukt aus dieser Arbeit eine DAMGO-induzierte Fluoreszenzänderung, die Membranlokalisation wurde bei diesem Konstrukt allerdings als sehr geringfügig eingeschätzt (Membran-: Zytosol- Verhältnis: 19 %). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass das in ¹⁹⁹ veröffentlichte Konstrukt ähnlich wenig geeignet zur Charakterisierung depolarisationsinduzierter Veränderungen der Rezeptorkonformation durch Anpassung der FRET-Ratio-Änderung an eine Boltzmann-Funktion wäre, wie bereits in dieser Arbeit generierte Konstrukte.

Ein kürzlich verwendeter Ansatz, der in lebenden Zellen allerdings nicht in der Form umsetzbar ist, verwendete einen Nanobody (Nb39), der als Aktivitätssensor an MOR in HDL-Partikeln eingesetzt wurde ²⁰⁰.

Daher verblieben in dieser Studie für den Nachweis der intrinsischen Spannungsabhängigkeit nur die angewandten Methoden, die aufgrund ihrer Eindeutigkeit einen klaren, wenn auch indirekten Nachweis erbrachten.

7.2 Die beobachteten spannungsabhängigen Veränderungen am MOR treten im Bereich der physiologischen Membranpotenziale auf.

Ausgehend von Experimenten, in denen eine Depolarisation durch Applikation hoher K^+ -Konzentrationen erzeugt wurde ³⁵, wurden über die letzten Jahre einige Methoden weiterentwickelt, um die Spannungsabhängigkeit von GPCRs zu charakterisieren. Ein recht aktueller Ansatz dabei ist eine atomistische Simulation von Rezeptoren unter Depolarisation, für die Kristallstrukturen verfügbar sind. Auf diese Weise wurden der M_2R und der DOR bereits charakterisiert ²⁰¹. Im Gegensatz zu den ratiometrischen FRET- Messungen oder den GIRK-Strom-Aufzeichnungen in HEK 293T Zellen werden die dort auftretenden Veränderungen aufgrund der limitierten Simulationszeit allerdings unter Simulation von Depolarisationsschritten von 1 V beobachtet. Der Vorteil der, in der vorliegenden Studie verwendeten Messaufbauten liegt darin, dass einzelne, lebende Zellen moderaten Veränderungen im Membranpotenzial für eine definierte Zeit unterzogen und die dabei auftretenden Veränderungen in der Signaltransduktion, sowohl als Veränderung in Ionenströmen, als auch Veränderungen in Protein-Interaktionen mittels FRET-basierter Assays beobachtet werden können.

Sowohl im G-Protein-Aktivierungsassay (siehe Kapitel 6.1.1), als auch der GRK2- (siehe Kapitel 6.3.1) und Arrestin-Rekrutierung (siehe Kapitel 6.2.1) wurden Depolarisationen vom Haltepotenzial (-90 mV) zu verschiedenen Potenzialen innerhalb der physiologischen

Bandbreite des Membranpotenzials¹ durchgeführt. In allen Fällen ließ sich die potenzialabhängige Signaländerung an eine sigmoidale Boltzmann Funktion anpassen und die dabei erhaltenen $V_{0,5}$ -Werte und Elementarladungsverschiebungen entsprachen den bereits für muskarinerge und adrenerge Rezeptoren publizierten Werten^{36,45,46,135}. Während die, in der GRK2-Rekrutierung und der Arrestin-Rekrutierung publizierten Werte sich in einem Fitting-Modell unterbringen ließen (siehe **Abbildung 23**, **Abbildung 27**, weitergehend diskutiert im nächsten Absatz), weichen die, in der G-Protein-Aktivierung ermittelten Werte etwas durch eine Abflachung der angepassten Boltzmann-Funktion bei Potenzialen ab +30 mV ab (siehe **Abbildung 16**). Da die depolarisationsinduzierte Steigerung der G-Protein-Antwort sehr stark ist, wäre es denkbar, dass bei hohen Depolarisationsschritten in einigen Zellen bereits eine Sättigung erreicht wurde. Da die, in die Boltzmann-Anpassung eingeschlossenen Zellen auf die Morphin-induzierte Antwort bei 0 mV normalisiert wurden und daher nicht in allen Zellen eine DAMGO-induzierte Maximalantwort bestimmt wurde, lässt sich nicht ausschließen, dass die maximale G-Protein-Aktivierung bei hoher Depolarisation unter Morphin auch mit der eingesetzten, niedrigen Konzentration bereits erreicht wird. Da der MOR als neuronaler Rezeptor in Geweben exprimiert wird, die hochfrequente Veränderungen im Membranpotenzial durchlaufen^{110,202}, sind Veränderungen, die innerhalb des physiologischen Bereichs des Membranpotenzials auftreten, von besonderem Interesse.

7.3 Die Spannungsabhängigkeit verändert die maximale Effektstärke des Morphins in besonders großem Umfang.

Zahlreiche Untersuchungen^{35,38,44,45,132,139} zur Spannungsabhängigkeit und insbesondere frühe Publikationen sahen Veränderungen in der Liganden-Affinität als spannungsabhängige Effekte. Erstmals erwähnt wurde die Möglichkeit einer veränderten Effektstärke basierend auf der Beobachtung, dass Depolarisation unter Gabe eines orthosterischen Antagonisten zu G_q -vermittelter Ca^{2+} -Mobilisation am $P2Y_1$ -Rezeptor führt⁴³. Während diese Beobachtung noch als ein indirekter Nachweis einer gesteigerten Effektstärke angesehen wird, konnte am α_{2A} AR unter Verwendung eines intramolekularen FRET-Sensors gezeigt werden, dass die spannungsabhängige Rezeptormodulation unter Gabe des Partialagonisten Clonidin auch bei Gabe sättigender Konzentration nicht verschwunden war⁴⁵. Weiterhin verlief die Deaktivierungskinetik des Rezeptors unter Clonidin-Applikation mehrfach schneller als das Auswaschen des Liganden. Aus diesen Beobachtungen konnten erstmals direkte Rückschlüsse auf eine depolarisationsbedingt veränderte Effektstärke geschlossen werden. In einer weiteren Publikation konnte unter Verwendung eines

intramolekularen FRET-Sensors am β_1 -AR erstmals für den nicht-synthetischen Liganden Adrenalin sowie den synthetischen Liganden Isoprenalin eine depolarisationsinduzierte Verringerung der maximalen Effektstärke festgestellt werden, die sich auch in veränderter Rezeptor-Arrestin – Interaktion zeigte ⁴⁶. Intramolekulare FRET-basierte Rezeptor-Sensoren sind in der Tat ein ideales Werkzeug um intrinsische Spannungsabhängigkeit nachzuweisen und durch kinetische Analysen Veränderungen der intrinsischen Effektstärke von veränderter Ligandenaffinität zu unterscheiden ¹⁹⁸. Wie in Kapitel 5 beschrieben, konnte in zahlreichen Ansätzen kein Konstrukt gefunden werden, welches ein ausreichend gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zeigte, um für eine derartige Charakterisierung zweckdienlich zu sein. Da der MOR im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Rezeptoren ^{45,46} jedoch für die untersuchten Liganden Aktivierung unter Depolarisation zeigt, und Morphin unter nicht-depolarisierten Bedingungen ein Ligand mit verringerter intrinsischer Effektstärke ist ⁴⁹, der sich in der Rezeptor – Arrestin – Interaktion durch eine verringerte Rekrutierung von Arrestin, auch bei Applikation sättigender Konzentration Morphin zeigt, wäre eine Steigerung in der Morphin-induzierten Arrestin-Rekrutierung ein direkter Nachweis einer erhöhten Effektstärke. In der Tat wurde für Morphin in der vorliegenden Studie eine bemerkenswerte Zunahme der Arrestin-Rekrutierung unter Depolarisation ermittelt. Ein Vergleich der Kinetik bei Zurückklemmen und Auswaschen des Liganden zeigte zudem, dass die depolarisationsinduzierten Veränderungen doppelt so schnell reversibel waren, wie sie unter Entfernung des Agonisten beobachtet werden konnten. Die, in der Arrestin-Interaktion beschriebene Zunahme der Rekrutierung unter Depolarisation folgte einer Membranpotenzial-abhängigen sigmoidalen Boltzmann Funktion und die aus der Funktion ermittelten charakteristischen $V_{0,5}$ - und Elementarladungsverschiebungswerte (-6 mV bzw. 0,64 e_0) fielen im Vergleich zu bisher publizierten Werten am α_{2A} AR ⁴⁵ (-20 mV bzw. 0,5 e_0), dem β_1 AR ⁴⁶ (-27 mV bzw. 0,49 e_0), dem M₁ AChR ⁴⁴ (-53 mV bzw. 0,76 e_0), M₂ AChR (-44 mV ³⁶/ -67 mV ¹³⁵ bzw. 0,85 e_0 ³⁶ /0,55 e_0 ¹³⁵) oder dem TP R ³⁸ (-46 mV bzw. 0,5 e_0) ähnlich aus, wobei der $V_{0,5}$ -Wert etwas höher liegt als die bisher publizierten Werte.

Die starke Veränderung in der intrinsischen Effektstärke des Liganden wurde ebenfalls in der Morphin-induzierten GRK2-Rekrutierung beobachtet. Da die maximale, Morphin-induzierte GRK2-Rekrutierung in nicht-depolarisierten Zellen nur 38 % der DAMGO-vermittelten GRK2-Rekrutierung beträgt ⁴⁸, wurde die spannungsabhängige Effektstärkensteigerung des Morphins auch im GRK2-Rekrutierungsassay analysiert. Hierbei wurde ebenfalls eine ausgeprägte Zunahme der Effektstärke des Morphins bei der Arrestin-Rekrutierung beobachtet (siehe Kapitel 6.3.1) und die daraus resultierende Beziehung zwischen

Membranpotenzial und Veränderung in der GRK2-Rekrutierung durch Anpassung der Werte an eine sigmoidale Boltzmann-Funktion analysiert. Es fanden sich in allen drei beobachteten Assays kleine Unterschiede zwischen den ermittelten $V_{0,5}$ - und Elementarladungsverschiebungswerten, die jedoch in einem vergleichbaren Rahmen liegen.

Die Beobachtung, dass die Morphin-induzierte GRK2- und Arrestin3-Rekrutierung in sehr ausgeprägtem Maße durch das Membranpotenzial moduliert werden, ist eine sehr interessante Beobachtung, die unter Umständen dazu beitragen kann zu erklären, warum Morphin-Applikation in verschiedenen Geweben zu verschieden starker Arrestin-induzierter Internalisierung führt ¹⁰⁸ und verdeutlicht nochmals, dass der zelluläre Kontext die Desensitivierungsprozesse maßgeblich beeinflussen kann.

7.4 Die starke spannungsabhängige Modulation des MOR wird sowohl in der G-Protein-Signaltransduktion, als auch in der GRK2- und Arrestin-Interaktion sichtbar.

Mit mehreren Assays wurden die Implikationen der Spannungsabhängigkeit des MOR beleuchtet. Dabei zeigte sich die Spannungsabhängigkeit der Morphin-induzierten Signaltransduktion auf allen untersuchten Ebenen: die MOR-induzierte Signaltransduktion, gemessen in der G_i -Aktivierung wird schon bei Depolarisation auf 0 mV mehr als verdoppelt (siehe Kapitel 6.1.1) und die GRK2-Rekrutierung zum aktivierten Rezeptor steigt ebenfalls um mehr als das Zweifache bei Depolarisation auf +30 mV. Meines Wissens nach wurde in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Veröffentlichung ⁴⁷ zum ersten Mal Spannungsabhängigkeit anhand von Veränderungen auf Ebene der GRK2-Rekrutierung gezeigt. Im Arrestin-Rekrutierungsassay waren die Depolarisations-induzierten Effekte noch prägnanter sichtbar, da sich hier eine Verdreifachung der Arrestin-Rekrutierung in nicht-depolarisierten Zellen zeigte (siehe Kapitel 6.2). Zunächst wurde im Falle der Morphin-induzierten Signaltransduktion in allen Signalwegen eine positive Modulation der Rezeptor-Aktivierung beobachtet. Eine positive Modulation wurde bereits für einige Rezeptoren beobachtet (mGluR₁ ¹³², LPAR ¹³¹, P2Y₁R ⁴¹, M₁R ⁴⁴, und ligandenabhängig auch im M₂R ¹³⁴ und M₃R ⁴⁴). Im Vergleich mit früheren Publikationen lässt sich das Ausmaß der Spannungsabhängigkeit des MOR anhand der Depolarisations-induzierten Unterschiede im Arrestin-Rekrutierungsassay gut quantifizieren: in Studien zur Spannungsabhängigkeit am α_{2A} AR wurde gezeigt, dass die Clonidin-vermittelte Arrestin-Rekrutierung bei Depolarisation auf +60 mV um etwa die Hälfte abnahm (Verdoppelung des Signals beim Zurückklemmen) ⁴⁵ und bei Depolarisation des β_1 AR

unter Adrenalin-Applikation eine rund 30 % Verringerung der Arrestin-Rekrutierung beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu führte eine starke Depolarisation bei Morphin-Applikation auf +60 mV beim MOR zu einer 4,9-fachen Steigerung in der Arrestin-Rekrutierung im Vergleich zu der initialen Antwort bei -90 mV.

Die leichten Unterschiede in der Stärke der detektierten Spannungsabhängigkeit zwischen der GRK2- und Arrestin-Rekrutierung (vgl. **Abbildung 23** und **Abbildung 28**) sind zunächst unerwartet, da beide Proteine eine direkte 1:1-Interaktion mit dem MOR eingehen und überexprimiert vorliegen. Im Allgemeinen unterlagen Messungen im GRK2-Rekrutierungsassay etwas größeren Störsignalen im steady state weshalb die Anpassung der Daten an eine sigmoidale Boltzmann-Funktion für die Daten aus der GRK2-Interaktion etwas schwieriger war. Neben der Messungenauigkeit wäre auch denkbar, dass die depolarisationsinduzierte Konformationsänderung am MOR in unterschiedlich starkem Ausmaß die GRK2-Rekrutierung und die Arrestin3-Interaktion beeinflusst. So wurde die GRK2-Rekrutierung zum MOR kürzlich ²⁰³ als Vorgang beschrieben, der sowohl aus der Interaktion mit Rezeptor-aktivierten G $\beta\gamma$ -Untereinheiten, als auch durch direkte Interaktion mit dem aktivierten MOR resultieren kann. Es ist durchaus denkbar, dass depolarisationsinduzierte Veränderungen nicht in gleichem Maße beide Rekrutierungswege beeinflussen und die veränderte Rezeptorkonformation zudem andere Auswirkungen auf die Interaktion zwischen dem MOR und Arrestin3 hat.

7.5 Auch in physiologischem Gewebe kann die Spannungsabhängigkeit des MOR beobachtet und gemessen werden.

Transfizierte HEK 293T Zellen stellen ein unkompliziertes, weil einfach und schnell zu kultivierendes und vielseitig nutzbares System dar um eine Vielzahl an Proteindynamiken untersuchen zu können ²⁰⁴. So konnten im Rahmen dieser Studie durch die Kombination aus FRET-basierten Assays und Spannungsklemme sowohl G-Protein-Aktivierung als auch die MOR – GRK2- und – Arrestin-Interaktion näher beleuchtet werden und anhand des überexprimierten GIRK Kanals auch Ionenströme bestimmt werden. Dabei ist vorteilhaft, dass vereinzelte, lebende Zellen betrachtet werden können, die im Gegensatz zu neuronalem Gewebe kein störendes spontanes oder spannungsabhängiges Öffnen co-exprimierter Ionenkanäle zeigen (eigene Erfahrung aus den Messungen) sowie keiner komplexen neuronalen Vernetzung unterliegen. Die Messungen von GIRK-Strömen in HEK 293T konnten so ohne Einsatz von Kanalblockern (z.B. TTX) erfolgen. In der Literatur wurden HEK 293 Zellen bereits häufiger als Expressions- und Untersuchungssystem zur Charakterisierung der

Spannungsabhängigkeit verwendet^{37,38,44–46}. Ein Vorteil der Messungen von FRET-basierten Assays in der *whole-cell* Spannungsklemme liegt jedoch in der Unabhängigkeit von GIRK-Kanal-Eigenschaften, wie der Strom-Spannungskennlinie. Dies beinhaltet die Möglichkeit, eine große Bandbreite an Membranpotenzialen (-120 mV bis +100 mV, aus eigener Erfahrung) charakterisieren zu können und eröffnet so die Möglichkeit, die gewonnenen Daten an eine sigmoidale Boltzmann-Funktion anzupassen und aus der Steigung der Funktionsgleichung die Elementarladungsverschiebung zu berechnen (siehe Kapitel 4.4.4). Diese FRET-basierten Assays waren somit sehr hilfreich um sich einen Überblick über das Ausmaß der Spannungsabhängigkeit auf molekularer Ebene zu verschaffen. Dennoch stellen transfizierte HEK 293T Zellen ein artifizielles System dar, da es sich um eine künstlich generierte Zelllinie handelt²⁰⁴, in der fluoreszent markierte Proteine überexprimiert vorliegen. Da die beobachtete Spannungsabhängigkeit am MOR anhand der FRET Daten als ausgeprägt beurteilt wurde, warf dies die Frage nach der pharmakologischen Relevanz in besonderem Maße auf. Hierfür sollten zunächst MOR-induzierte GIRK-Ströme in HEK 293T Zellen gemessen werden. Aufgrund der linearen Beziehung zwischen Membranpotenzial und messbaren Strömen am GIRK-Kanal bei Messung in Einwärtsrichtung, die eine Messung großer, gut aufgelöster Amplituden ermöglicht, wurde diese Methode bereits mehrfach zur Charakterisierung spannungsabhängiger G_i -gekoppelter Rezeptoren angewendet^{45,130}. Messung unter diesen Bedingungen zeigte, dass das Morphin-induzierte Signal bei -20 mV im Vergleich zur Messung bei -90 mV im Vergleich zu einer sättigenden DAMGO-Konzentration deutlich größer war (siehe Kapitel 6.4.1). Dieser Befund konnte somit als erste Bestätigung der pharmakologischen Relevanz des in FRET-basierten Assays beobachteten Effekts auf Ebene der Steigerung der Morphin-induzierten GIRK-Ströme angesehen werden. In einer Publikation, die sich mit dem G_q -gekoppelten $P2Y_1R$ in HEK 293 Zellen befasste¹⁸⁹, wurde beobachtet, dass schon kleine Veränderungen in der extrazellulären K^+ -Konzentration Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion haben, die nicht alleinig an verändertem Membranpotenzial liegen. Obwohl die Veränderung an einem G_q -induzierten Signalweg gemessen wurde, ist es grundsätzlich nicht auszuschließen, dass unphysiologisch hohe K^+ -Konzentration auch Auswirkungen auf MOR-aktivierte Signalwege haben könnten.

Ein weiteres Problem, das grundsätzlich bei Verwendung eines hoch K^+ - niedrig Na^+ -Puffers diskutiert werden könnte, ist die allosterisch modulierende Rolle des Na^+ auf den MOR: basierend auf den über 40 Jahre alten Beobachtungen, dass niedrige Na^+ -Konzentration die Ligandenbindung von Agonisten am MOR negativ beeinflusst, wurde später entdeckt, dass Na^+ als allosterischer Modulator der Ligandenbindung fungiert²⁰⁵. Daher wurde in einem weiteren

Experiment an transfizierten HEK 293T Zellen der Vergleich des Morphin-induzierten GIRK-Stroms bei verschiedenen Haltepotenzialen in der, für die antinozizeptiven Effekte verantwortlichen Auswärtsrichtung durchgeführt. Hierfür wurde ein extrazellulärer Puffer verwendet, der sich in seiner Zusammensetzung an physiologischem Extrazellulärmilieu orientiert (Protokolle siehe Kapitel 4.4.3.1). Auch in dieser Konstellation, in der aufgrund der, in diesem Puffersystem veränderten Strom-Spannungskennlinie ein Vergleich der relativen, Morphin-induzierten GIRK-Ströme zwischen -50 mV und 0 mV erfolgte, wurde eine ähnliche, spannungsabhängige Zunahme des Morphin-induzierten Stroms beobachtet (siehe Kapitel 6.4.1 und 6.4.2). Somit konnte also der, an der Analgesie beteiligte Effekt der erhöhten K⁺-Leitfähigkeit über GIRK-Kanäle ¹¹⁰ in HEK 293T Zellen als spannungsabhängig moduliert nachgewiesen werden. Daher blieb als Letztes die Frage, ob diese Effekte auch in nativem Gewebe nachgewiesen werden können?

Ein System, das sich hervorragend zur Charakterisierung der MOR-modulierten GIRK-Ströme anbietet, sind Schnittpräparationen, die LC Neurone enthalten, da sich in diesem Gewebe neben dem MOR keine weiteren Opioid-Rezeptoren befinden ^{190,206}. Es wurde daher eine Charakterisierung der hemmenden, Opioid-vermittelten GIRK-Ströme in diesem System in Auswärtsrichtung vorgenommen. Die Erfahrung, die während der Messungen gewonnen wurde, zeigte, dass sich für die Charakterisierung der GIRK-Ströme lediglich der Bereich zwischen -80 mV und -40 mV eignet. Bei niedrigeren Membranpotenzialen wurden die beobachteten Ströme sehr klein und bei höheren Membranpotenzialen öffneten sich Ionenkanäle spontan, die auch nicht durch Applikation von TTX geblockt werden konnten. Es wurde daher ein Protokoll generiert, das von einem Haltepotenzial von -60 mV ausgehend auf -80 mV und anschließend -40 mV depolarisierte. Die dabei nach Gabe von Met-Enkephalin oder Morphin gemessenen Ströme wurden immer in Relation zueinander betrachtet und es zeigte sich, insbesondere bei Normalisierung der jeweiligen depolarisationsinduzierten Stromänderung auf den Agonisten-vermittelten Strom bei Haltepotenzial, dass die Morphin-induzierte Antwort bei Depolarisation von -60 mV auf -40 mV deutlich stärker anstieg, als dies bei Met-Enkephalin der Fall war (siehe **Abbildung 32 B**). Mit weiteren Kontrollexperimenten wurde auch sichergestellt, dass dies ein Protokoll-unabhängiger Effekt ist (siehe Kapitel 6.4.4). Einschränkend muss zwar gesagt werden, dass bei der Depolarisation von -80 mV auf -60 mV für Morphin kein signifikant stärkerer Anstieg der Morphin-induzierten GIRK-Ströme im Vergleich zu den Met-Enkephalin-induzierten Strömen festgestellt werden konnte. Dies könnte zum einen dadurch begründet sein, dass die generell messbaren Ströme im Bereich von -80 mV sehr klein sind und daher relative Veränderungen schwerer feststellbar sind und zum anderen

dadurch erklärbar sein, dass die depolarisationsinduzierten Veränderungen am Rezeptor in diesem Bereich des Membranpotenzials noch nicht ausreichend groß sind, erkennbar auch an der dort flacheren Steigung in der Boltzmann-Funktion (siehe Kapitel 6.1.1). Da die Responsivität der GIRK-Ströme unter Morphin-Applikation bei Depolarisation von -60 mV auf -40 mV im Vergleich zu den peptidischen Liganden so deutlich erhöht war, wird die pharmakologische Relevanz der Spannungsabhängigkeit des MOR evident.

Ein kürzlich erschienenes Paper, das Signalwege in dauerdepolarisierten Rückenmarksneuronen untersucht ²⁰⁷, konnte ebenfalls depolarisationsinduzierte Effekte auf die maximale Effektstärke von Morphin und DAMGO in Neuronen und HEK Zellen finden, die rezeptorvermittelt auftraten.

7.6 Die Spannungsabhängigkeit des MOR ist ligandenspezifisch.

Die Depolarisations-induzierte Änderung der MOR-vermittelten Signaltransduktion wurde in allen untersuchten Assays für das Alkaloid Morphin sowie den peptidischen Liganden DAMGO untersucht. In LC Neuronen sowie der G-Protein-Aktivierung und der Arrestin-Rekrutierung wurde auch Met-Enkephalin charakterisiert. Es wurden zudem der Morphin-ähnliche alkaloidische Ligand Buprenorphin und der synthetische Ligand Fentanyl im G-Protein-Aktivierungsassay charakterisiert. Dabei zeigte sich für Morphin sowie das Morphin-ähnliche Buprenorphin eine herausragende Spannungsabhängigkeit (siehe Kapitel 6.1.1, 6.1.6, 6.2.3, 6.3.2 und 6.4.4), die sich im Falle des Morphins aufgrund der Beobachtung der bereits diskutierten Effekte in einer Erhöhung der maximalen Effektstärke zeigt.

Im Falle der peptidischen Liganden DAMGO und Met-Enkephalin konnten keine vergleichbaren Effekte beobachtet werden. Für diese Liganden, die unter gleichen Bedingungen wie Morphin gemessen wurden, fanden sich nur deutlich kleinere aktivierende Effekte bei Depolarisation. In der Arrestin-Rekrutierung zeigten sich bei Applikation einer sättigenden Konzentration DAMGO nur kleine aktivierende Effekte, während Morphin, ein Agonist mit niedriger intrinsischer Effektstärke in depolarisierten Zellen um ein mehrfaches an Effektstärke hinzugewann, bis Morphin annähernd die gleiche Effektstärke erlangte wie DAMGO in nicht-depolarisierten Zellen (siehe Kapitel 6.2.1). Sollte die Arrestin-Interaktion durch sättigende Konzentration DAMGO bei Haltepotenzial bereits gesättigt sein, könnte man mit diesem Assay bei Depolarisation womöglich eine auf Rezeptorebene vorhandene spannungssensitive Modulation in dieser Interaktion nicht mehr abbilden ²⁰⁸. Um dies besser einschätzen zu können, wurde bei einer Konzentration DAMGO, die in nicht depolarisierten Zellen etwa eine

Morphin-gleiche Antwort erzeugt, das gleiche Depolarisationsprotokoll durchgeführt. In diesem Falle war die gemessene spannungssensitive Steigerung der Arrestin-Rekrutierung etwas größer als unter Applikation sättigender Konzentration, allerdings waren die unter DAMGO-Applikation gemessenen Effekte weiterhin deutlich kleiner als unter Morphin-Applikation. Denkbar ist für DAMGO eine duale Spannungssensitivität, bestehend aus einer Mischung von Affinitätssteigerung und Effektstärkenzunahme. Während die erhöhte Affinität nur in nicht-gesättigten Bedingungen sichtbar ist, kann in Sättigung lediglich eine Zunahme der Effektstärke beobachtet werden.

Wie die Daten aus der G-Protein-Aktivierung und der Arrestin-Rekrutierung nahelegen, scheint es auch innerhalb der peptidischen Liganden Unterschiede in der Spannungssensitivität zu geben. Während DAMGO eine moderate, aktivierende Spannungssensitivität zeigt, wurde unter Met-Enkephalin keinerlei Spannungssensitivität nachgewiesen. Dies ist eine interessante Entdeckung, die Raum für Spekulation lässt. DAMGO und Met-Enkephalin stellen Opioide mit flexiblem Gerüst dar ⁵⁴. Daher könnten kleine strukturelle Unterschiede schon einen großen Einfluss auf die eingenommene Position in der Ligandenbindetasche haben, die unter Depolarisation dann unterschiedlich ausgeprägt moduliert werden könnte.

Die Bedeutung der molekularen Struktur des Liganden für die Qualität und Stärke der Spannungsabhängigkeit zeigt sich auch Beispiel des Fentanyls. Dieser Ligand, der keinerlei Ähnlichkeit zu den peptidischen oder Morphin-ähnlichen Liganden aufweist, zeigt bei Depolarisation sogar deaktivierende Eigenschaften (siehe Kapitel 6.1.5).

Wie aus vorliegender Arbeit ersichtlich werden sollte, sind die depolarisationsinduzierten Effekte auf den MOR je nach chemischer Struktur des Liganden unterschiedlich stark ausgeprägt. Die spannungsabhängige Rezeptormodulation zeigt sich im Expressionssystem der transfizierten HEK 293 Zelle ligandenabhängig in allen untersuchten Assays und ist auch in nativen Systemen messbar. Tritt eine Modulation der maximalen Effektstärke des Liganden am MOR in starkem Maße auf, so wie dies bei Bindung des alkaloidischen Liganden Morphin der Fall ist, so tritt diese bereits nach kurzer Stimulationsdauer mit Depolarisationsschritten, die sich im Bereich des physiologischen Membranpotenzials befinden, auf.

7.7 Perspektiven

Die Mechanismen, die der, in dieser Arbeit beschriebenen und aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als pharmakologisch relevant eingestuft (siehe Kapitel 6.4)

Spannungsabhängigkeit zugrunde liegen, sind jedoch weitgehend ungeklärt. Da der MOR ligandenabhängig eine sehr ausgeprägte Spannungssensitivität zeigt, könnte er als hervorragendes Modellsystem für weitergehende, den Mechanismus beleuchtende Studien dienen.

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit nur eine kleine Stichprobe an verfügbaren Liganden für den μ -Opioid-Rezeptor charakterisiert wurde, so lässt sich hieraus doch ein grundsätzliches Konzept erahnen, das die spannungsabhängige Modulation der ligandenvermittelten Rezeptoraktivierung beschreibt: wird der Rezeptor durch alkaloidische, Morphin-ähnliche Liganden aktiviert, so führt Depolarisation zu einer weiteren Aktivierung; viel schwächer messbar ist eine solche Aktivierung bei peptidischen Liganden und unter Fentanyl-vermittelter Rezeptoraktivierung kommt es bei Depolarisation gar zur Deaktivierung. Basierend auf der Erkenntnis, dass sich strukturelle Unterschiede zwischen den Liganden in starkem Maße auf die resultierenden spannungssensitiven Modulationen am Rezeptor auswirken können, ist es für die mechanistische Aufklärung wichtig, die Bindung des Liganden am Rezeptor zu kennen und durch gezielte Mutagenese die, für die Spannungsabhängigkeit entscheidenden Aminosäuren zu identifizieren⁶.

Gelingt es, ein strukturbasiertes Vorhersagemodell zu etablieren, das *in silico* das Verhalten des Liganden in stark depolarisiertem Gewebe einschätzen lässt, so könnte dies ermöglichen, dass auch in der präklinischen Arzneistoffentwicklung spannungsabhängige Modulation der ligandenvermittelten Rezeptoraktivierung evaluiert werden kann. Dies könnte möglicherweise die bisherigen *in silico* Vorhersagemodelle verbessern, da die Berücksichtigung der Spannungsabhängigkeit bei einem Rezeptor, der derart stark spannungsabhängig moduliert wird, wie es beim MOR der Fall ist, helfen könnte, Widersprüche zwischen den aus präklinischer Forschung erwarteten Nebenwirkungen und den klinisch beobachteten unerwünschten Wirkungen zu erklären (z.B. einer erhöhten Mortalität durch Atemdepression durch Fentanyl bei equi-analgetischen Dosen zu anderen Opioiden²⁰⁹, aber einer verringerten Tendenz, Übelkeit zu erzeugen²¹⁰). Auch gewebsspezifische Unterschiede in der Fähigkeit eines Liganden am aktivierten MOR nachgeschaltete Effektoren zu rekrutieren (z.B. der schnellen Morphin-vermittelten Rezeptorendozytose in striatalen Neuronen) könnten möglicherweise zumindest teilweise durch spannungsabhängige Modulationen erklärbar sein.

⁶ Diese Arbeit wurde von Sina Kirchhofer nach ihrer abgeschlossenen Masterarbeit im Rahmen ihres Dissertationsvorhabens bereits begonnen.

8. Literaturverzeichnis

1. Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. *Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M., eds. (2000). In Principles of Neural Science, vol. 4 (New York: McGraw-Hill), pp. 1227–1246. (2000).*
2. Spektrum Akademischer Verlag. Membranpotential. *Lexikon der Physik* <https://www.spektrum.de/lexikon/physik/membranpote> (1998).
3. Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 394–401 (1957).
4. Bezanilla, F. How membrane proteins sense voltage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 323–332 (2008).
5. Armstrong, M. C. & Bezanilla, F. Currents related to Movement of the Gating Particles of the Sodium Channels. *Nature* **242**, 459–461 (1973).
6. Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K. & Okamura, Y. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* **435**, 1239–1243 (2005).
7. Parent, L., Supplisson, S., Loo, D. & Wright, E. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J. Membr. Biol.* **130**, 203 (1992).
8. Nakao, M. & Gadsby, D. C. Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump. *Nature* **323**, 628–630 (1986).
9. Schoppa, N. E., McCormack, K. E. N., Tanouye, M. A. & Sigworth, F. J. The Size of Gating Charge in Wild-Type and Mutant Shaker Potassium Channels. *Science*. **255**, 1712–1715 (1992).
10. Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M. & Bezanilla, F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**, 1159–1167 (1996).
11. Noceti, F. *et al.* Effective gating charges per channel in voltage-dependent K⁺ and Ca²⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **108**, 143–55 (1996).
12. Starace, D. M. & Bezanilla, F. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* **427**, 548–553 (2004).
13. Männikkö, R., Elinder, F. & Larsson, H. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* **419**, 837–41 (2002).
14. Smith, P. L., Baukrowitz, T. & Yellen, G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**, 833–6 (1996).
15. Zampighi, G. A. *et al.* A Method for Determining the Unitary Functional Capacity of Cloned Channels and Transporters Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. *J. Membr. Biol.* **148**, 65–78 (1995).
16. M, H. *et al.* Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature* **403**, 898–901 (2000).
17. Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H. & Mitaku, S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* **520**, 97–

- 101 (2002).
18. Weis, W. I. & Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 897–919 (2018).
 19. Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 531–556 (2013).
 20. Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 829–842 (2017).
 21. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–1272 (2003).
 22. Kobilka, B. K. & Deupi, X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 397–406 (2007).
 23. Warne, T. *et al.* The structural basis for agonist and partial agonist action on a $\beta(1)$ -adrenergic receptor. *Nature* **469**, 241–245 (2011).
 24. Mahoney, J. P. & Sunahara, R. K. Mechanistic insights into GPCR-G protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **41**, 247–254 (2016).
 25. Park, P. S.-H. Ensemble of G Protein-Coupled Receptor Active States. *Curr. Med. Chem.* **19**, 1146–1154 (2012).
 26. Manglik, A. *et al.* Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**, 321–327 (2012).
 27. Huang, W. *et al.* Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature* **524**, 315–21 (2015).
 28. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the β 2adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–181 (2011).
 29. Irannejad, R. *et al.* Conformational biosensors reveal GPCR signaling from endosomes. *Nature* **495**, 534–538 (2013).
 30. Bouvier, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 274–286 (2001).
 31. Beedle, A. *et al.* Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Neurosci. Nat.* **7**, 118–125 (2004).
 32. Liu, F. *et al.* Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* **403**, 274–280 (2000).
 33. Bockaert, J. J., Fagni, L., Dumuis, A. & Marin, P. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol. Ther.* **103**, 203–221 (2004).
 34. Christopoulos, A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 198–210 (2002).
 35. Ben-Chaim, Y., Tour, O., Dascal, N., Parnas, I. & Parnas, H. The M2 muscarinic G-protein-coupled receptor is voltage-sensitive. *J. Biol. Chem.* **278**, 22482–22491 (2003).
 36. Ben-Chaim, Y. *et al.* Movement of ‘gating charge’ is coupled to ligand binding in a G-

- protein-coupled receptor. *Nature* **444**, 106–109 (2006).
37. Hoppe, A. *et al.* The allosteric site regulates the voltage sensitivity of muscarinic receptors. *Cell. Signal.* **42**, 114–126 (2018).
38. Kurz, M., Krett, A. L. & Bünemann, M. Voltage dependence of prostanoid receptors. *Mol. Pharmacol.* **97**, 267–277 (2020).
39. Ben Chaim, Y., Bochnik, S., Parnas, I. & Parnas, H. Voltage Affects the Dissociation Rate Constant of the m2 Muscarinic Receptor. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0074354
40. Martinez-Pinna, J., Tolhurst, G., Gurung, I. S., Vandenberg, J. I. & Mahaut-Smith, M. P. Sensitivity limits for voltage control of P2Y receptor-evoked Ca²⁺ mobilization in the rat megakaryocyte. *J. Physiol.* **555**, 61–70 (2004).
41. Martinez-Pinna, J. *et al.* Direct Voltage Control of Signaling via P2Y1 and Other G alpha q -coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 1490–1498 (2005).
42. Mahaut-Smith, M. P., Martinez-Pinna, J. & Gurung, I. S. A role for membrane potential in regulating GPCRs? *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 421–429 (2008).
43. Gurung, I. S., Martinez-Pinna, J. & Mahaut-Smith, M. P. Novel consequences of voltage-dependence to G-protein-coupled P2Y1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 882–889 (2008).
44. Rinne, A., Mobarec, J. C., Mahaut-Smith, M., Kolb, P. & Bünemann, M. The mode of agonist binding to a G protein – coupled receptor switches the effect that voltage changes have on signaling. *Sci. Signal.* **8**, ra110 (2015).
45. Rinne, A., Birk, A. & Bünemann, M. Voltage regulates adrenergic receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1536–41 (2013).
46. Birk, A., Rinne, A. & Bünemann, M. Membrane potential controls the efficacy of catecholamine-induced β 1-Adrenoceptor activity. *J. Biol. Chem.* **290**, 27311–27320 (2015).
47. Ruland, J. G., Kirchhofer, S. B., Klindert, S., Bailey, C. P. & Bünemann, M. Voltage modulates the effect of μ -receptor activation in a ligand-dependent manner. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 3489–3504 (2020).
48. Miess, E. *et al.* Multisite phosphorylation is required for sustained interaction with GRKs and arrestins during rapid μ -opioid receptor desensitization. *Sci. Signal.* **11**, 1–15 (2018).
49. McPherson, J. *et al.* μ -Opioid Receptors: Correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization. *Mol. Pharmacol.* **78**, 756–766 (2010).
50. Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven-Transmembrane Receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 639–650 (2002).
51. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R. & Huang, X. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol.* **428**, 3850–3868 (2016).
52. Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T. & Bourne, H. R. Lipid modifications of Trimeric G Proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 503–506 (1995).
53. Gilman, G. G Proteins- Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annu. Rev.*

- Biochem.* **56**, 615–49 (1987).
54. Koehl, A. *et al.* Structure of the μ -opioid receptor – Gi protein complex. *Nature* **558**, 547–552 (2018).
55. Dror, R. O. *et al.* Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science*. **348**, 1361–1365 (2015).
56. Oldham, W. M. & Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 60–71 (2008).
57. Van Eps, N. *et al.* Interaction of a G protein with an activated receptor opens the interdomain interface in the alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9420–9424 (2011).
58. Chung, K. Y. *et al.* Conformational changes in the G protein Gs induced by the β 2 adrenergic receptor. *Nature* **477**, 611–617 (2011).
59. Westfield, G. H. *et al.* Structural flexibility of the Gas α -helical domain in the β 2-adrenoceptor Gs complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16086–16091 (2011).
60. McKee, E. E., Bentley, A. T., Smith, R. M. & Ciaccio, C. E. Origin of guanine nucleotides in isolated heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 466–472 (1999).
61. Bünemann, M., Frank, M. & Lohse, M. J. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 16077–16082 (2003).
62. Peleg, S., Varon, D., Ivanina, T., Dessauer, C. W. & Dascal, N. G α i controls the gating of the G protein-activated K $^{+}$ channel, GIRK. *Neuron* **33**, 87–99 (2002).
63. Frank, M., Thümer, L., Lohse, M. J. & Bünemann, M. G protein activation without subunit dissociation depends on a G α i-specific region. *J. Biol. Chem.* **280**, 24584–24590 (2005).
64. Lüscher, C. & Slesinger, P. A. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 301–315 (2010).
65. Yamada, Mitsuhiko, Inanobe, Atsushi Kurachi, Y. G Protein Regulation of Potassium Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* **50**, 723–757 (1998).
66. Lüscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C. & Nicoli, R. A. G Protein-Coupled Inwardly Rectifying K $^{+}$ Channels (GIRKs) Mediate Postsynaptic but Not Presynaptic Transmitter Actions in Hippocampal Neurons. *Neuron* **19**, 687–95 (1997).
67. Lesage, F. *et al.* Molecular Properties of Neuronal G-protein-activated Inwardly Rectifying K $^{+}$ Channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 28660–28667 (1995).
68. Lesage, F. *et al.* Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K $^{+}$ channels in the brain. *FEBS Lett.* **353**, 37–42 (1994).
69. Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K. & Clapham, D. E. G($\beta\gamma$) Binds Directly to the G Protein-gated K $^{+}$ Channel, IKACH. *J. Biol. Chem.* **270**, 29059–29062 (1995).
70. Jelacic, T. M., Kennedy, M. E., Wickman, K. & Clapham, D. E. Functional and

- biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K⁺(GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J. Biol. Chem.* **275**, 36211–36216 (2000).
71. Slesinger, P. A. *et al.* Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K⁺channels. *Neuron* **16**, 321–331 (1996).
72. Huang, C. L., Slesinger, P. A., Casey, P. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Evidence that direct binding of Gβγ to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* **15**, 1133–1143 (1995).
73. Corey, S. & Clapham, D. E. The Stoichiometry of Gβγ Binding to G-protein-regulated Inwardly Rectifying K⁺ Channels (GIRKs). *J. Biol. Chem.* **276**, 11409–11413 (2001).
74. Rubinstein, M. *et al.* Divergent regulation of GIRK1 and GIRK2 subunits of the neuronal G protein gated K⁺ channel by GαiGDP and Gβγ. *J. Physiol.* **587**, 3473–3491 (2009).
75. Clancy, S. A. *et al.* Pertussis-toxin-sensitive Gα subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 375–389 (2005).
76. Singh, P., Wang, B., Maeda, T., Palczewski, K. & Tesmer, J. J. G. Structures of Rhodopsin Kinase in Different Ligand States Reveal Key Elements Involved in G Protein-coupled Receptor Kinase Activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 14053–14062 (2008).
77. Benovic, J. L. *et al.* Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the β-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 8879–8882 (1987).
78. Wilden, U., Hall, S. & Kühn, H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1174–1178 (1986).
79. Pitcher, J. A., Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. G Protein – Coupled Receptor Kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 653–692 (1998).
80. Gurevich, V. V & Gurevich, E. V. Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *Int. J. Molecular Sci.* **18**, 1–17 (2017).
81. Komolov, K. E. *et al.* Structural and Functional Analysis of a β2 -Adrenergic Receptor Complex with GRK5. *Cell* **169**, 407–421 (2017).
82. Kang, Y. *et al.* Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* **523**, 561–567 (2015).
83. Li, L. *et al.* G Protein-coupled Receptor Kinases of the GRK4 Protein Subfamily Phosphorylate Inactive G Protein-coupled Receptors (GPCRs). *J. Biol. Chem.* **290**, 10775–10790 (2015).
84. Mann, A., Illing, S., Miess, E. & Schulz, S. Different mechanisms of homologous and heterologous μ-opioid receptor phosphorylation. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 311–316 (2014).
85. Ribeiro, F. M. *et al.* Phosphorylation-independent Regulation of Metabotropic Glutamate Receptor 5 Desensitization and Internalization by G Protein-coupled Receptor Kinase 2 in Neurons. *J. Biol. Chem.* **284**, 23444–23453 (2009).

86. Krasel, C., Bünemann, M., Lorenz, K. & Lohse, M. J. β -arrestin binding to the β 2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 9528–35 (2005).
87. Violin, J. D., Ren, X. R. & Lefkowitz, R. J. G-protein-coupled receptor kinase specificity for β -arrestin recruitment to the β 2-adrenergic receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **281**, 20577–20588 (2006).
88. Zhang, J. *et al.* Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor signaling: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in receptor desensitization and resensitization. *Recept. Channels* **5**, 193–199 (1997).
89. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 483–510 (2007).
90. Lefkowitz, R. J. Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 413–422 (2004).
91. Hunzicker-Dunn, M., Gurevich, V. V., Casanova, J. E. & Mukherjee, S. ARF6: A newly appreciated player in G protein-coupled receptor desensitization. *FEBS Lett.* **521**, 3–8 (2002).
92. Goodman, O. J. *et al.* Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447–450 (1996).
93. Laporte, S. A. *et al.* The β 2-adrenergic receptor/ arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 3712–3717 (1999).
94. Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Keen, J. H. & Benovic, J. L. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J. Biol. Chem.* **272**, 15011–6 (1997).
95. Bohn, L. M. *et al.* Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking β -Arrestin 2. *Science*. **286**, 2495–2498 (1999).
96. Hara, M. R., Sachs, B. D., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Pharmacological blockade of a β 2AR- β -arrestin-1 signaling cascade prevents the accumulation of DNA damage in a behavioral stress model. *Cell Cycle* **12**, 219–224 (2013).
97. Kohout, T. A., Lin, F.-T., Perry, S. J., Conner, D. A. & Lefkowitz, R. J. β -Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 1601–1606 (2001).
98. Gurevich, E. V. & Gurevich, V. V. Arrestins: Ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* **7**, 1–10 (2006).
99. Grundmann, M. *et al.* Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat. Commun.* **9**, 1–7 (2018).
100. Luttrell, L. M. *et al.* Manifold roles of β -arrestins in GPCR signaling elucidated with siRNA and CRISPR/Cas9. *Sci. Signal.* **11**, (2018).
101. Raehal, K. M., Walker, J. K. L. & Bohn, L. M. Morphine Side Effects in β -Arrestin 2 Knockout Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 1195–1201 (2005).
102. Kliewer, A. *et al.* Morphine-induced respiratory depression is independent of β -arrestin2 signalling. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 2923–2931 (2020).

103. Gillis, A. *et al.* Low intrinsic efficacy for G protein activation can explain the improved side effect profiles of new opioid agonists. *Sci. Signal.* **13**, (2020).
104. Whistler, J. L., Chuang, H., Chu, P., Jan, L. Y. & von Zastrow, M. Functional Dissociation of μ Opioid Receptor Signaling and Endocytosis. *Neuron* **23**, 737–746 (1999).
105. Martini, L. & Whistler, J. L. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 556–564 (2007).
106. Keith, D. E. *et al.* Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J. Biol. Chem.* **271**, 19021–19024 (1996).
107. Keith, D. E. *et al.* μ -Opioid Receptor Internalization: Opiate Drugs Have Differential Effects on a Conserved Endocytic Mechanism *In Vitro* and in the Mammalian Brain. *Mol. Pharmacol.* **53**, 377–384 (1998).
108. Haberstock-Debic, H., Kim, K.-A., Yu, Y. J. & von Zastrow, M. Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J. Neurosci.* **25**, 7847–7857 (2005).
109. Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E. & Gilbert, P. E. The effects of Morphine- and Nalorphine- like drugs in the nondependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **197**, 517–532 (1976).
110. Stein, C. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Med.* **67**, 433–451 (2016).
111. Law, P. Y., Reggio, P. H. & Loh, H. H. Opioid Receptors: Toward Separation of Analgesic from Undesirable Effects. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 275–282 (2013).
112. Granier, S. *et al.* Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* **485**, 400–4 (2012).
113. Wu, H. *et al.* Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* **485**, 327–332 (2012).
114. Dhawan, B. N. *et al.* International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* **48**, 567–592 (1996).
115. 21st WHO Expert Committee. Executive Summary on The Selection and Use of Essential Medicines 2017. 1–13 (2017). Available at: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.
116. Morgan, M. M. & Christie, M. J. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1322–1334 (2011).
117. Tedford, H. W. & Zamponi, G. W. Direct G Protein Modulation of Cav2 Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* **58**, 837–862 (2006).
118. Wang, H.-B. *et al.* Coexpression of δ - and μ -opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 13117–13122 (2010).
119. Spahn, V. *et al.* Opioid withdrawal increases transient receptor potential vanilloid 1 activity in a protein kinase A-dependent manner. *Pain* **154**, 598–608 (2013).
120. Endres-Becker, J. *et al.* μ -Opioid Receptor Activation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Currents in Sensory Neurons in A Model of

- Inflammatory Pain. *Mol. Pharmacol.* **71**, 12–18 (2006).
121. Cai, Q. *et al.* Morphine inhibits acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* **1554**, 12–20 (2014).
122. Ingram, S. L. & Williams, J. T. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron* **13**, 179–186 (1994).
123. Gold, M. S. & Levine, J. D. DAMGO inhibits prostaglandin E₂-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* **212**, 83–86 (1996).
124. Just, S. *et al.* Differentiation of Opioid Drug Effects by Hierarchical Multi-Site Phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* **83**, 633–639 (2013).
125. Illing, S., Mann, A. & Schulz, S. Heterologous regulation of agonist-independent μ -opioid receptor phosphorylation by protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1330–1340 (2014).
126. Williams, J. T. *et al.* Regulation of μ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacol. Rev. Pharmacol Rev* **65**, 223–254 (2013).
127. Mohr, K., Schmitz, J., Schrage, R., Tränkle, C. & Holzgrabe, U. Molecular alliance - From orthosteric and allosteric ligands to dualsteric/bitopic agonists at G protein coupled receptors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 508–516 (2013).
128. Walwyn, W., Scott, J., Maga, M., Evans, C. J. & Hales, T. G. Delta Receptors Are Required for Full Inhibitory Coupling of μ Receptors to Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons. *Mol. Pharmacol.* **76**, 134–143 (2009).
129. Sahlholm, K., Marcellino, D., Nilsson, J., Fuxe, K. & Arhem, P. Voltage-sensitivity at the human dopamine D_{2S} receptor is agonist-specific. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 1216–1221 (2008).
130. Sahlholm, K., Nilsson, J., Marcellino, D., Fuxe, K. & Arhem, P. Voltage sensitivities and deactivation kinetics of histamine H₃ and H₄ receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 3081–3089 (2012).
131. Martinez-Pinna, J., Gurung, I. S., Mahaut-Smith, M. P. & Morales, A. Direct voltage control of endogenous lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptors in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **588**, 1683–93 (2010).
132. Ohana, L., Barchad, O., Parnas, I. & Parnas, H. The metabotropic glutamate G-protein-coupled receptors mGluR3 and mGluR1a are voltage-sensitive. *J. Biol. Chem.* **281**, 24204–24215 (2006).
133. Kupchik, Y. M. *et al.* A novel fast mechanism for GPCR-mediated signal transduction-control of neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* **192**, 137–151 (2011).
134. Dekel, N., Priest, M. F., Parnas, H., Parnas, I. & Bezanilla, F. Depolarization induces a conformational change in the binding site region of the M₂ muscarinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 285–290 (2012).
135. Navarro-Polanco, R. A. *et al.* Conformational changes in the M₂ muscarinic receptor induced by membrane voltage and agonist binding. *J. Physiol.* **589**, 1741–1753 (2011).
136. Noda, M. *et al.* Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced

- from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121–7 (1984).
137. Bezanilla, F. How membrane proteins sense voltage. *Nat. Rev. | Mol. cell Biol.* **9**, 323–332 (2008).
138. Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R. Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* **16**, 1169–1177 (1996).
139. Sahlholm, K., Marcellino, D., Nilsson, J., Fuxe, K. & Århem, P. Differential voltage-sensitivity of D2-like dopamine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 496–501 (2008).
140. Martinez-Pinna, J. *et al.* Direct voltage control of signaling via P2Y1 and other Gαq-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 1490–1498 (2005).
141. Parnas, H. *et al.* Depolarization initiates phasic acetylcholine release by relief of a tonic block imposed by presynaptic M2 muscarinic receptors. *J. Neurophysiol.* **93**, 3257–69 (2005).
142. Nockemann, D. *et al.* The K⁺ channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid - mediated analgesia. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1263–1277 (2013).
143. Andersson, S., Davis, D. L., Dahlbäck, H., Jornvall, H. & Russell, D. W. Cloning, Structure, and Expression of the Mitochondrial Cytochrome P-450 Sterol 26-Hydroxylase, a Bile Acid Biosynthetic Enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 8222–8229 (1989).
144. Southern, P. & Berg, P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* **1**, 327–41 (1982).
145. Invitrogen. *Invitrogen pcDNATM3.1(–) User Manual*. (2010).
146. Wise, A., Rees, S., Lee, M. & Milligan, G. Interactions of the α2A -adrenoceptor with multiple Gi -family G-proteins: studies with pertussis toxin-resistant G-protein mutants. *Biochem. J* **321**, 721–728 (1997).
147. Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. & Lohse, M. J. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2105–9 (1996).
148. Wolters, V., Krasel, C., Brockmann, J. & Bunemann, M. Influence of G q on the Dynamics of M3-Acetylcholine Receptor-G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Interaction. *Mol. Pharmacol.* **87**, 9–17 (2014).
149. Graham, F., Smiley, J., Russell, W. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59–74 (1977).
150. Schmitz, S. & Desel, C. *Der Experimentator Zellbiologie*. (Springer Spektrum, 2018). doi:10.1007/978-3-662-56111-9
151. Mühlhardt, C. *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. (Springer Spektrum, 2013). doi:10.1007/978-3-642-34636-1
152. Papworth C, Bauer JC, B. J. QuikChange site-directed mutagenesis. *Strategies* **9**, 3–4 (1996).
153. Sanger, F. & Coulson, A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, 441–446 (1975).

154. Hein, L., Altman, J. D. & Kobilka, B. K. Two functionally distinct $\alpha 2$ -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* **402**, 181–184 (1999).
155. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. & Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **8**, 6–10 (2010).
156. Lohse, M. J. *et al.* Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 159–165 (2008).
157. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **6**, 55–75 (1948).
158. Lohse, M. J., Nuber, S. & Hoffmann, C. Fluorescence / Bioluminescence Resonance Energy Transfer Techniques to Study G-Protein-Coupled Receptor Activation and Signaling. *Pharmacol. Rev.* **64**, 299–336 (2012).
159. Miyawaki, A. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 357–373 (2011).
160. Prasher, D., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233 (1992).
161. Tsien, R. Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–44 (1998).
162. Berney, C. & Danuser, G. FRET or No FRET: A Quantitative Comparison. *Biophys. J.* **84**, 3992–4010 (2003).
163. Cole, K. S. Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch. Sci. Physiol. (Paris)*. **3**, 253–258 (1949).
164. Wilson, W. A. & Goldner, M. M. Voltage clamping with a single microelectrode. *J. Neurobiol.* **6**, 411–422 (1975).
165. Molleman, A. *Patch Clamping*. Wiley (2002). doi:10.1002/0470856521
166. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100 (1981).
167. Vilardaga, J.-P. *et al.* GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells. *Mol. Endocrinol.* **23**, 590–599 (2009).
168. Chang, S. & Ross, E. M. Activation Biosensor for G Protein-Coupled Receptors: A FRET-Based m1 Muscarinic Activation Sensor That Regulates Gq. *PLoS One* **7**, (2012).
169. Vilardaga, J.-P., Bünemann, M., Krasel, C., Castro, M. & Lohse, M. J. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat. Biotechnol.* **21**, 807–812 (2003).
170. Ziegler, N., Bätz, J., Zabel, U., Lohse, M. J. & Hoffmann, C. FRET-based sensors for the human M1-M3- and M5-acetylcholine receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 1048–1054 (2011).
171. Wess, J. & Oupling, R. E. G. R. C. Molecular Basis of Receptor / G-Protein-Coupling

- Selectivity. *Pharmacol. Ther.* **80**, 231–264 (1998).
172. Zeng, F., Hopp, A. & Soldner, A. Use of a Disulfide Cross-linking Strategy to Study Muscarinic Receptor Structure and Mechanisms of Activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 16629–16640 (1999).
173. Hoffmann, C. *et al.* A FLAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat. Methods* **2**, 171–176 (2005).
174. Dorsch, S., Klotz, K., Engelhardt, S., Lohse, M. & Bünemann, M. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat. Methods* **6**, 225–230 (2009).
175. Bodmann, E.-L. *Regulation of Rho-activating proteins by heterotrimeric G proteins : Sensitivity of G α Rho GEF interaction is determined by dissociation kinetics.* (2014).
176. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science*. **312**, 217–224 (2006).
177. Granier, S., Kim, S., Fung, J. J., Bokoch, M. P. & Parnot, C. FRET-based measurement of GPCR conformational changes. in *Methods in Molecular Biology* **552**, 253–68 (2009).
178. Ellisman, M. H., Tsien, R. Y. & Lohse, M. J. Fluorescent labelling of tetracycline-tagged proteins in intact cells. *Nat. Protoc.* **5**, 1666–1677 (2011).
179. Corbett, A. D., Henderson, G., McKnight, A. T. & Paterson, S. J. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.* **147**, S153–S162 (2006).
180. Drug Enforcement Association. *National Drug Threat Assessment Summary (USA)*. (2015).
181. Connor, M., Osborne, P. B. & Christie, M. J. μ -Opioid receptor desensitization: Is morphine different ? *Br. J. Pharmacol.* **143**, 685–696 (2004).
182. Handa, B. *et al.* Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **70**, 531–540 (1981).
183. Kirchhofer, S. *Agonist specific voltage sensitivity at the μ -Opioid Receptor.* (2017).
184. Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. *Neurowissenschaften*. (Springer Nature, 2018).
185. Krupnick, J. & Benovic, J. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289–319 (1998).
186. Krapivinsky, G. *et al.* G($\beta\gamma$) binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K⁺ channel activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 16946–16952 (1998).
187. North, R. A. & Williams, J. . T. On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus neurones. *J. Physiol.* **364**, 265–280 (1985).
188. Hommers, L. G., Lohse, M. J. & Bünemann, M. Regulation of the inward rectifying properties of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺(GIRK) channels by G $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* **278**, 1037–1043 (2003).
189. Pitt, S. J., Martinez-Pinna, J., Barnard, E. A. & Mahaut-Smith, M. P. Potentiation of P2Y Receptors by Physiological Elevations of Extracellular K⁺ via a Mechanism

- Independent of Ca²⁺ Influx. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1705–1713 (2005).
190. Bailey, C. P. *et al.* Mu-opioid receptor desensitization in mature rat neurons: lack of interaction between DAMGO and morphine. *J. Neurosci.* **23**, 10515–10520 (2003).
 191. Bailey, C. P. *et al.* Involvement of PKC α and G-protein-coupled receptor kinase 2 in agonist-selective desensitization of μ -opioid receptors in mature brain neurons. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 157–164 (2009).
 192. Lowe, J. D. *et al.* Role of G Protein-Coupled Receptor Kinases 2 and 3 in μ -Opioid Receptor Desensitization and Internalization. *Mol. Pharmacol.* **6**, 347–356 (2015).
 193. Lago, J., Rodriguez, L. P., Blanco, L., Vieites, J. M. & Cabado, A. G. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: Distribution, toxicity, origin and therapeutical uses. *Mar. Drugs* **13**, 6384–6406 (2015).
 194. Moreno-Galindo, E. G. *et al.* Relaxation gating of the acetylcholine-activated inward rectifier K⁺ current is mediated by intrinsic voltage sensitivity of the muscarinic receptor. *J. Physiol.* **589**, 1755–67 (2011).
 195. Foster, S. R. *et al.* Discovery of Human Signaling Systems: Pairing Peptides to G Protein-Coupled Receptors. *Cell* **179**, 895–908 (2019).
 196. Rashid, A. J., O'Dowd, B. F. & George, S. R. Minireview: Diversity and complexity of signaling through peptidergic G protein-coupled receptors. *Endocrinology* **145**, 2645–2652 (2004).
 197. Alexander, S. P. H. *et al.* THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **174**, S17–S129 (2017).
 198. Lohse, M. J., Vilardaga, J. P. & Bünemann, M. Direct optical recording of intrinsic efficacy at a G protein-coupled receptor. *Life Sci.* **74**, 397–404 (2003).
 199. Patriarchi, T. *et al.* Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science (80-.)*. **360**, 1–8 (2018).
 200. Livingston, K. E., Mahoney, J. P., Manglik, A., Sunahara, R. K. & Traynor, J. R. Measuring Ligand Efficacy at the Mu-Opioid Receptor Using a Conformational Biosensor. *Elife* **7**, e32499 (2018).
 201. Vickery, O. N., Machtens, J.-P., Tamburrino, G., Seeliger, D. & Zachariae, U. Structural Mechanisms of Voltage Sensing in G Protein-Coupled Receptors. *Structure* **24**, 997–1007 (2016).
 202. Raynor, K. *et al.* Pharmacology of Cloned K-, d-, and μ -Opioid Receptors. *Mol. Pharmacol.* **45**, 330–334 (1993).
 203. Stoeber, M. *et al.* Agonist-selective recruitment of engineered protein probes and of GRK2 by opioid receptors in living cells. *Elife* **9**, 1–20 (2020).
 204. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).
 205. Yabaluri, N. & Medzihradsky, F. Regulation of μ -opioid receptor in neural cells by extracellular sodium. *J. Neurochem.* **68**, 1053–61 (1997).
 206. North, R. A. & Williams, J. T. On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus neurones. *J. Physiol.* **364**, 265–280 (1985).

- 207. Carbajal, A. G., Bavencoffe, A., Walters, E. T. & Dessauer, C. W. Depolarization-dependent C-Raf signaling promotes hyperexcitability and reduces opioid sensitivity of isolated nociceptors after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **40**, 6522–6535 (2020).
- 208. Kelly, E. Efficacy and ligand bias at the μ -opioid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 1430–1446 (2013).
- 209. Ferrante, F. M. Opioids. in *Postoperative Pain Management* (eds. Ferrante, F. M. & Vadeboncoeur, T. R.) 145–209 (Churchill Livingstone, 1993).
- 210. Khaled, A. E. A., Tafish, R. & Zourob, H. Morphine versus fentanyl for spinal post-caesarean analgesia: a randomised controlled trial. *Lancet* **391**, S20 (2018).

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der Strukturen des aktiven und inaktiven MOR.	10
Abbildung 2: Vergleich der Strukturen von MOR und β_2AR in G-Protein-gebundener Konformation.	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung des G-Protein-Aktivierungszyklus.	14
Abbildung 4: Darstellung der Desensitivierung, Internalisierung und Degradation bzw. Wiederverwertung von GPCRs.	18
Abbildung 5: Produktinformation von Invitrogen über den pcDNA3.1 Leervektor;	30
Abbildung 6: Übersicht über den zeitlichen Ablauf einer PCR mit Phusion-Polymerase;	34
Abbildung 7: Übersicht über den Ablauf einer Mutagnese-PCR mit Phusion-Polymerase;	36
Abbildung 8: Anregungs- und Emissionsspektren von CFP und YFP;	45
Abbildung 9: Messaufbau in der Kombination aus FRET und whole-cell voltage-clamp:	47
Abbildung 10: Messaufbau zur Messung der LC Präparationen.	48
Abbildung 11: Bleichkorrekturen.	50
Abbildung 12: Struktur des MOR und Markierung der Insertionsstelle S266 (türkis). ..	54
Abbildung 13: Darstellung der Lokalisation des μOR-S266-sYFP2-C-CFP Konstruktes.	55
Abbildung 14: Beispielhafte Messung des μOR-S266-sYFP2-C-CFP Konstruktes.	55
Abbildung 15: FRET Messungen der Konstrukte SI sowie SI mit Linkerregion.	57
Abbildung 16: Depolarisation verstärkt die Morphin-vermittelte G-Protein-Aktivierung.	63
Abbildung 17: DAMGO-vermittelte G-Protein-Aktivierung wird moderat verstärkt durch Depolarisation.	65
Abbildung 18: Spannungssensitivität des MOR lässt sich in gleichem Maße bei der G_o- und der G_i-Aktivierung zeigen;	66
Abbildung 19: Met-Enkephalin verhält sich spannungsinsensitiv.	67
Abbildung 20: Depolarisation führt zu einer moderaten Reduktion der Fentanyl-induzierten G-Protein-Aktivierung.	68
Abbildung 21: Buprenorphin-induzierte G-Protein-Aktivierung reagiert stark sensitiv auf Veränderungen im Membranpotenzial.	70

Abbildung 22: Spannungsabhängige Effekte auf die G-Protein-Aktivierung zeigen sich auch bei einer raschen Abfolge kurzer Depolarisationen.....	71
Abbildung 23: Die maximale Effektstärke der Morphin-vermittelten Arrestin-Rekrutierung wird durch Depolarisation erhöht.	73
Abbildung 24: Kinetischer Vergleich des Einflusses von Depolarisation und Agonisten-Entzug auf die MOR – Arrestin – Interaktion.	75
Abbildung 25: Depolarisation unter DAMGO-Applikation verdeutlicht die ligandenspezifischen Unterschiede.	77
Abbildung 26: Die Spannungsinsensitivität des Met-Enkephalins bestätigt sich in der Arrestin-Rekrutierung.....	78
Abbildung 27: Die Effektstärke der Morphin-induzierten GRK2 – Rekrutierung ist unter Depolarisation stark erhöht.	81
Abbildung 28: Effekte der Depolarisation auf Morphin- oder DAMGO-induzierte GRK2-Rekrutierung verdeutlichen Liganden-spezifische Unterschiede.....	83
Abbildung 29: Ströme in Einwärtsrichtung zeigen Spannungssensitivität des MOR.	85
Abbildung 30: Ströme in Auswärtsrichtung zeigen stärkere Spannungssensitivität des Morphins.	87
Abbildung 31: Daten aus GIRK-Strömen lassen sich mit einem Gi-Protein-Aktivierungsassay reproduzieren.	89
Abbildung 32: Morphin- induzierte GIRK-Ströme in LC Neuronen werden stärker potenziert als DAMGO- oder Met-Enkephalin-induzierte Ströme.	92

10. Publikationen und wissenschaftliche Betreuung

10.1 Konferenzbeiträge und Abstracts

DGPT 2020, Leipzig: *Co-Autorenschaft:* "Analysis of molecular determinants for voltage dependent activation of the μ -opioid receptor with different opioid analgesics" (bisher nicht publiziert)

DGPT 2019, Stuttgart: *Posterpräsentation:* "Morphine-activated neuronal GIRK currents reflect voltage sensitivity of the μ -opioid receptors" Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2019) 392(Suppl 1): 1.

Co-Autorenschaft: "Analysis of molecular determinants for agonist specific voltage sensitivity of the μ -opioid receptor" Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2019) 392(Suppl 1): 1.

BPS Pharmacology 2018, London: *Posterpräsentation:* "LB 29; Voltage sensitivity alters Morphine signaling at the μ -opioid receptor" Br J Pharmacol (2019); 176: 3008.

DGPT 2018, Göttingen: *Co-Autorenschaft:* "Agonist specific voltage sensitivity at the μ -opioid receptor" Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2018) 391 (Suppl 1): 1.

DGPT 2017, Heidelberg: *Mündlicher Vortrag:* "Voltage sensitivity of the μ -opioid receptor".

6th Focussed meeting on Cell Signalling, Leicester: *Posterpräsentation* "Interaction of the μ -opioid receptor with G-proteins and GRK2" (2016) Proceedings of the British Pharmacological Society 14(1):abst034P.

DGPT 2016, Berlin: *Posterpräsentation* "Interaction of the μ -opioid receptor with G-proteins and GRK2" Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2016) 389 (Suppl 1): S 95 – 116.

10.2 Artikel in wissenschaftlichen Journalen

Ruland, J. G. *et al.* Voltage modulates the effect of μ receptor activation in a ligand - dependent manner. *Br J Pharmacol.* **177**, 3489-3504 (2020).

Miess, E. *et al.* Multisite phosphorylation is required for sustained interaction with GRKs and arrestins during rapid μ -opioid receptor desensitization. *Sci. Signal.* **11**, 1–15 (2018).

10.3 Stipendien

Reisestipendium im Rahmen des GLISTEN-Förderprogramms (COST Action 1207) für einen fünfwöchigen Forschungsaufenthalt an der University of Bath im Labor von C.P. Bailey (Juli – August 2016)

10.4 Wissenschaftliche Betreuung

Im Rahmen meiner Dissertation durfte ich die Masterarbeit ‚Agonist-specific voltage sensitivity at the μ -Opioid receptor‘ von Sina Kirchhofer betreuen.

11. Lebenslauf

12. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der Spannungsabhängigkeit des μ -Opioid-Rezeptors

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 30. 10. 2020

.....
(Julia Ruland)

13. Danksagungen

Ich möchte allen danken, die mich auf dem Weg der Promotion unterstützt haben. Hier gilt der Dank vor allem....

Herrn Prof. Dr. Bünemann, der mir ermöglicht hat an diesem spannenden Thema arbeiten zu dürfen und der stets mit motivierendem und äußerst hilfreichem Rat zur Seite stand. Danke, dass Sie mich in all den Jahren immer unterstützt und ermutigt haben. Auch die Möglichkeit, im Forschungsaufenthalt in Bath die LC Messungen zu erlernen habe ich als sehr interessante Erfahrung mitgenommen. Ich denke gerne an meine Promotionszeit in Ihrer Gruppe zurück.

Sina Kirchhofer, mit der ich einige Jahre an der Spannungsabhängigkeit des μ -Opioid-Rezeptors arbeiten durfte. Es hat mich sehr gefreut, Dich bei deinem 6-Wochenpraktikum und Deiner Masterarbeit betreut haben zu dürfen. In unserer gemeinsamen Zeit am Institut habe ich mich immer über den Austausch mit Dir als engagierte und sehr hilfsbereite Kollegin gefreut. Ich danke Dir auch für die Unterstützung bei der Publikation des Papers, bei der Du binnen kurzer Zeit unglaublich viele Daten gemessen hast, die das Paper nochmals aufgewertet haben. Danke auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Sebastian Klindert für das unglaublich große Engagement, mit dem er bei seinem vier Monate dauernden Forschungsaufenthalt in Bath die Messungen der GIRK Ströme in LC Neuronen bewerkstelligen konnte. Dieser Einsatz hat die gesamte Publikationsarbeit sehr bereichert.

Chris Bailey for giving us the opportunity to measure voltage sensitivity in LC neurons. You have supported us with such a profound knowledge and commitment which helped a lot.

Cornelius Krasel, der immer ein offenes Ohr und unglaublich viele Ideen zur Problemlösung für mich hatte und der mich mit den nötigen Konstrukten versorgt hat.

Weiterhin danke ich allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG, die mir geholfen haben, die notwendigen Techniken zu erlernen, bei organisatorischen oder technischen Problemen geholfen haben oder bei denen ich immer ein offenes Ohr gefunden habe. Auch für das gute Arbeitsklima möchte ich mich bei der ganzen Gruppe bedanken. Es hat mir immer sehr viel Freude bereitet, im Institut mit Euch zu arbeiten.

Ferner gilt mein besonderer Dank meiner Familie. Jeder von Euch hat mir den Rückhalt gegeben und mich tatkräftig unterstützt, so dass das Promotionsvorhaben am Ende gelingen konnte.